Aus der Kinderklinik und -Poliklinik der Freien Universität Berlin
(Kaiserin Auguste Victoria Haus)
Direktor: Professor Dr. med. Adalbert Loeschke

Zwei Methoden zur Reihenuntersuchung von Urin (Screening) auf einige angeborene Stoffwechselkrankheiten mit Hyperaminoazidurie

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hartmut Siemes
aus Remscheid

1970

Aus der Kinderklinik und -Poliklinik der Freien Universität Berlin
(Kaiserin Auguste Victoria Haus)
Direktor: Professor Dr. med. Adalbert Loeschke

Zwei Methoden zur Reihenuntersuchung von Urin (Screening) auf einige angeborene Stoffwechselkrankheiten mit Hyperaminoazidurie

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hartmut Siemes
aus Remscheid

Dekan: Professor Dr.med.Herbert L a x

Referent: Professor Dr.med.Adalbert L o e s c h k e

Korreferent: Professor Dr.med.Egon W e r n e r

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 26.6.1970

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. Allgemeiner Teil

I. Angeborene Stoffwechselkrankheiten mit Hyperaminoazidurie 4

II. Ursachen der Hyperaminoazidurie bei angeborenen Stoffwechselkrankheiten 7

III. Allgemeine Probleme bei der Wahl des Untersuchungsmaterials 8

IV. Abgrenzung der Hyperaminoazidurien bei angeborenen Stoffwechselkrankheiten von solchen anderer Genese 9

V. Ziel der Reihenuntersuchungen 9

B. Spezieller Teil

I. Quantitative Bestimmung der Gesamtaminosäurenkonzentration im Urin 9

1. Einleitung 9

2. Durchführung der Versuche 12

a) Manuelle Bestimmungsmethode 12

aa) Herstellung der Eichkurve 12

bb) Urinuntersuchung 13

b) Halbautomatische Bestimmungsmethode 13

3. Untersuchung der Eignung der TNBS-Methode zur quantitativen Bestimmung der Aminosäurenkonzentration im Urin 17

4. Bezug der Aminosäurenkonzentration im Urin auf die Kreatininkonzentration 20

5. Quantitative Bestimmung der Kreatininkonzentration im Urin 21

Einleitung 21

Durchführung der Versuche

a) Manuelle Methode 21

b) Halbautomatische Bestimmungsmethode 23

aa) Herstellung der Eichkurve 25

bb) Bestimmung der Kreatininkonzentration im Urin 25

6. Ergebnisse der Bestimmung der Aminosäurenkonzentration im Urin, bezogen auf die Kreatininkonzentration 26

7. Diskussion der Ergebnisse 36

Seite

II. Quantitative Bestimmung der Konzentration von SH-Gruppen- und S-S-Brücken-haltigen Aminosäuren im Urin 42

1. Einleitung 42

2. Methodik 43

3. Durchführung der SH-Gruppen-Bestimmung 46

a) Manuelle Bestimmungsmethode 46

aa) Herstellung der Eichkurve 46

bb) Urinuntersuchung 46

b) Halbautomatische Bestimmungsmethode 47

4. Ergebnisse der Bestimmung der Konzentration der SH-Gruppen- und S-S-Brükken-haltigen Aminosäuren, bezogen auf die Kreatininkonzentration 50

5. Diskussion der Ergebnisse 61

C. Zusammenfassung 64

Literaturverzeichnis 66

A. Allgemeiner Teil

I. Angeborene Stoffwechselkrankheiten mit Hyperaminoazidurie

Zu den angeborenen Stoffwechselkrankheiten mit Hyperaminoazidurie gehören in erster Linie die Aminosäurenstoffwechselstörungen, daneben als Anomalie des Kohlehydratstoffwechsels die Galaktosämie und als Störung des Kupferstoffwechsels der Morbus WILSON. Ein Teil dieser Krankheiten geht mit einer erhöhten Serumkonzentration einzelner oder mehrerer Aminosäuren einher; teilweise tritt gleichzeitig oder ausschließlich eine erhöhte Aminosäurenausscheidung im Urin auf.

In der Tabelle 1 sind die häufigeren Aminosäurenstoffwechselstörungen mit erheblicher Aminoazidurie aufgeführt, außerdem die Galaktosämie und der Morbus WILSON. Genauere Aussagen über die Häufigkeit sind in der Regel nicht möglich, da zu wenig Ergebnisse systematischer Reihenuntersuchungen der Bevölkerung vorliegen. Die Tabelle 1 wurde zusammengestellt nach STANBURY, WYNGAARDEN and FREDRICHSON (Editors): "The Metabolic Basis of Inherited Disease", 2nd Edition 1966 by M^{c} Graw-Hill, Inc..

Tabelle 1

In dieser Tabelle bedeuten:

a) Krankheitsbezeichnung
b) Häufigkeit
c) Klinik: wichtigste Symptome und Befunde (außer Hyperaminoazidurie)
d) Im Serum vorwiegend vermehrt auftretende Aminosäuren
e) Im Urin erheblich vermehrt auftretende Aminosäuren
f) Wahrscheinlicher Stoffwechseldefekt

a) Ahorn-Sirup Erkrankung
b) 1:40000
c) Fütterungsschwierigkeiten, Erbrechen, Spastik, muskuläre Hypertonie, fehlender MORO-Reflex, (Krämpfe), typischer Geruch!
d) Leucin, Isoleucin, Valin
e) Leucin, Isoleucin, Valin
f) Blockierung der Decarboxylierung der transaminierten Metabolite von Leucin, Isoleucin und Valin

a) Cystinurie

b) 1% aller Steine der ableitenden Harnwege

c) Steine in den ableitenden Harnwegen, Minderwuchs

d) --

e) Cystin, Lysin, Arginin, Ornithin

f) Generalisierter Transportdefekt vor allem die renale tubuläre Resorption betreffend

a) FANCONI-Syndrom

b) --

c) Ernährungsschwierigkeiten, Rachitis, Minderwuchs, Polyurie, Albuminurie, Glucosurie, Phosphaturie, Azidose, erniedrigte Serumphosphatkonzentration, erniedrigte Serum-Natriumkonzentration

d) --

e) Massive generalisierte Aminoazidurie

f) Multipler Defekt der renalen Transportmechanismen

a) Galaktosämie

b) 1:30000 bis 1:40000

c) Erbrechen, Durchfall, Dehydration, Katarakt, Hepatosplenomegalie, Lebercirrhose, geistige Retardierung, Galaktosurie, Albuminurie

d) --

e) Massive generalisierte Aminoazidurie

f) Umwandlung von Galaktose-1-phosphat in Uridindiphosphatgalaktose mittels Uridindiphosphatglukose

a) HARTNUPsche Erkrankung

b) --

c) Intermittierend auftretender, roter, schuppender Ausschlag bei Sonnenlichtexposition, psychische Veränderungen, emotionale Instabilität bis Delirium, cerebellare Ataxie

d) --

e) Alanin, Serin, Threonin, Asparagin, Glutamin, Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Histidin und Citrullin um das 5- bis 10fache erhöht

f) Generalisierter Transportdefekt betreffend eine Gruppe der Monoaminomonokarbonsäuren, die Umwandlung von Tryptophan in Formylkynurenin ist blockiert

a) Histidinämie

b) --

c) Geistige Retardierung, Sprachdefekte, verzögerte Sprachentwicklung

d) Histidin

e) Histidin

f) Umwandlung von Histidin in Urocaninsäure mittels der Histidase ist gestört

a) Homocystinurie

b) --

c) Geistige Retardierung, Krämpfe, Linsenektopie, feines helles Haar

d) Methionin

e) Homocystin

f) Die von der Cystathioninsynthetase katalysierte Umwandlung von Homocystein zu Cystathionin mittels Anlagerung von Serin ist blockiert

a) Hyperglycinurien

b) --

c) Renaler Typ: Steine in den ableitenden Harnwegen (Oxalatsteine), asymptomatisch verlaufend

Überlauftyp: Erbrechen, Apathie, Koma, Azidose, Dehydration

d) Renaler Typ: --

Überlauftyp: Glycin, Leucin, Isoleucin, Valin, Threonin und Methionin

e) Renaler Typ und Überlauftyp: Glycin

f) Renaler Typ: Störung im Transportmechanismus

Überlauftyp: Umwandlung von Glycin in Serin ist gestört

a) WILSONsche Erkrankung

b) --

c) Extrapyramidal motorische Störungen, Tremor, Rigor, Spastik, Lebercirrhose, KAYSER-FLEISCHERscher Ring, Glukosurie, Phosphaturie, im Serum niedrige Kupfer- und Ceruloplasminkonzentration

d) --

e) Generalisierte Aminoazidurie

f) Defekt der Ceruloplasminbildung

II. Ursachen einer vermehrten Aminosäurenausscheidung im Urin bei angeborenen Stoffwechselkrankheiten

Eine Hyperaminoazidurie bei den angeborenen Aminosäurenstoffwechselstörungen kann verschiedene Ursachen haben:

1. Primär renale Form:
In diesem Fall liegt ein enzymatisch bedingter Defekt der tubulären Rückresorption bestimmter Aminosäuren vor. Bei der Cystinurie werden z. B. die im Glomerulumfiltrat auftretenden Aminosäuren Cystin, Lysin, Arginin und Ornithin nicht wieder resorbiert [1].

2. Sekundär renale Form:
Durch Ablagerung einer Aminosäure im Nierengewebe wird die Nierenfunktion beeinträchtigt, beispielsweise bei der Cystinose durch Speicherung von Cystin.
Hinweise für eine normalerweise nicht bestehende tubuläre Sekretion einer Aminosäure gibt es bei der Cystathioninurie [2].

3. "Überlaufform":
Die generalisierte Stoffwechselstörung führt zu einer so starken Erhöhung der Serumkonzentration bestimmter Aminosäuren, daß deren tubuläre Maximalkapazität der renalen Rückresorption überschritten wird, z. B. bei der Citrullinämie [3].

4. Unbekannte Ursachen:
Bei vielen angeborenen Aminosäurenstoffwechselkrankheiten sind die Ursachen der Hyperaminoazidurien nicht bekannt, beispielsweise auch bei dem FANCONI-Syndrom.

Auf welche Art und Weise die Galaktosämie und der Morbus WILSON zu einer vermehrten Aminosäurenausscheidung führen, ist bisher nicht genau geklärt.

III. Allgemeine Probleme bei der Wahl des Untersuchungsmateriales

Labordiagnostische Untersuchungen auf angeborene Stoffwechselkrankheiten werden in erster Linie mit Serum und Urin der Patienten durchgeführt. Zum Nachweis der abnormen Konzentrationen bestimmter Aminosäuren und deren Metabolite in diesen Untersuchungsmaterialien sind bisher aufwendige Methoden notwendig, in der Regel die Säulenchromatographie. Folgende Überlegungen sind vor der Anwendung einer neuen Untersuchungsmethode

hinsichtlich der Frage Serum oder Urin als Untersuchungsmaterial zu berücksichtigen:

1. Untersucht man bei Vorliegen einer primär renalen Form der Aminosäurenstoffwechselstörung das Serum, so findet man keine pathologisch veränderten Konzentrationen der betreffenden Aminosäuren. Bei der Cystinurie beispielsweise wurde dieses nachgewiesen [1].

2. Umgekehrt braucht die im Serum stark vermehrt auftretende Aminosäure im Urin nicht erhöht zu erscheinen, wie es bei der Cystinose z. B. der Fall ist [4].

Da die häufigeren bekannten Aminosäurenstoffwechselkrankheiten mit einer Aminoazidurie einhergehen, könnte die quantitative Bestimmung der Aminosäurenausscheidung im Urin einen Hinweis auf das Vorliegen einer solchen Krankheit liefern. Dieses ist aber nur zu erwarten, wenn einzelne oder eine Reihe von Aminosäuren extrem vermehrt auftreten, was bei der häufigsten Aminosäurenstoffwechselstörung, der Phenylketonurie, nicht der Fall ist. Für diese Krankheit stehen aber einfache Teste zur Verfügung (Eisen-III-chloridprobe, Phenistix-Teststäbchen, GUTHRIE-Test), die routinemäßig durchgeführt werden.

IV. Abgrenzung der Hyperaminoazidurien bei angeborenen Stoffwechselkrankheiten von solchen anderer Genese

Schwierigkeiten bietet die Abgrenzung der Hyperaminoazidurien, die auf einer Stoffwechselkrankheit beruhen, von solchen, die durch zahlreiche andere Erkrankungen ausgelöst werden können. Dazu wird neben der Berücksichtigung der übrigen Symptome und Befunde des Patienten die genauere Analyse der Aminosäuren mittels Dünnschicht- und Säulenchromatographie notwendig sein. Folgende Erkrankungen und Zustände können die Ursache einer Hyperaminoazidurie sein: Frühgeburt, erste Postnatalperiode, Schwangerschaft, Vitamin C- und D-Mangel, Glukokortikoidtherapie, Mehlnährschaden, schlecht eingestellter Diabetes mellitus, schwere Säuglingsenteritis, Nephrose, Crush-Syndrom, Schwermetallvergiftungen, Coeliakie, Lebererkrankungen, Leukosen, generalisierte Tumoren, Röntgenbestrahlungen, Verbrennungen, Muskeldystrophien u.A. [5].

V. Ziel der Reihenuntersuchungen

Der systematischen Aufdeckung von angeborenen Stoffwechselstörungen dienen sogenannte Screening-Tests. Sie sollen die Untersuchung einer großen Zahl von Personen mit einem möglichst geringen Zeit- und Arbeitsaufwand erlauben. Sie werden durchgeführt mit dem Ziel, eine Stoffwechselkrankheit schon dann beim Patienten festzustellen, bevor die eigentliche Krankheitssymptomatik sich ausgebildet hat, damit durch geeignete therapeutische und diätetische Maßnahmen (sofern solche für die jeweilige Krankheit bekannt sind) ein Auftreten der bedrohlichen Symptome verhindert werden kann. In diesem Zusammenhang soll auf die guten Erfolge bei der Therapie der frühzeitig erkannten Fälle von Phenylketonurie hingewiesen werden.

B. Spezieller Teil

Im folgenden wird ein sowohl manuell als auch halbautomatisch durchführbares colorimetrisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung: 1. der Gesamtaminosäuren und 2. der SH-Gruppen- und S-S-Brückenhaltigen Aminosäuren im Urin beschrieben. Die gemessenen Konzentrationen werden auf die Kreatininkonzentration in derselben Urinprobe bezogen; diese Konzentration wird ebenfalls manuell oder halbautomatisch bestimmt.

I. Quantitative Bestimmung der Gesamtaminosäurenkonzentration im Urin

1. Einleitung:

Zur Bestimmung der Aminogruppen im Urin sind titrimetrische, gasometrische und colorimetrische Methoden entwickelt worden, welche alle eine Reihe von Nachteilen besitzen.

Die Formol-[6] und Kupfertitration[7] der primären Aminogruppen liefern bedeutend höhere Werte als die gasometrische Methode nach Van SLYKE und Mitarbeitern [8], mit welcher der α-Aminostickstoff bestimmt wird. Bei der gasometrischen Methode stört Harnstoff, der vorher entfernt werden muß. Weniger aufwendig als die titrimetrischen und gasometrischen Methoden sind colorimetrische. Bei diesen wird häufig Ninhydrin als Farbreagenz angewendet [9], das aber z. B. mit Aminoalkoholen, Aminozuckern und auch stickstofffreien Substanzen Farbstoff bildet [10].

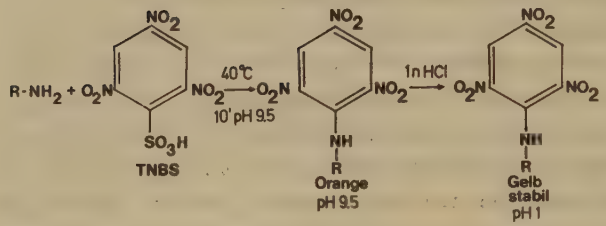
Neben Ninhydrin wird Naphthochinon-4-Sulfonat zur colorimetrischen Bestimmung des Aminostickstoffs im Urin angewendet [11]. Die Reaktion ist unspezifisch, Harnsäure, Ammoniak und Sulfonamidderivate interferieren. Ein weiteres Farbreagenz ist 1-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol [12]. Die Reaktion ist verhältnismäßig spezifisch; Ammoniak stört.

SATAKE et al. [13] verwendeten erstmalig 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) zur spektrophotometrischen Bestimmung der primären Aminogruppen von Aminosäuren, TNBS reagiert nicht mit Harnstoff oder Ammoniak, die bei den bisher genannten Methoden stören. Außer den primären Aminogruppen der Aminosäuren gehen aber auch diejenigen der Peptide (nur eine Aminogruppe pro Molekül), Amine, Aminoalkohole und Aminozucker diese Reaktion ein, während die Iminosäuren (Prolin, Hydroxyprolin) hiermit nicht bestimmt werden können. Primäre Aminogruppen der genannten Verbindungen, welche die Aminosäurebestimmung beeinträchtigen können, kommen aber im Vergleich zu denen der Aminosäuren selbst normalerweise nur in so geringer Menge im Urin vor, daß sie die Aminosäurenbestimmung mit TNBS nicht wesentlich beeinträchtigen [14].

Von PALMER und PETERS [15] wurde eine halbautomatische Bestimmungsmethode der Aminosäuren im Serum und Plasma mit TNBS entwickelt. Um die Genauigkeit dieser Methode zu überprüfen, haben die Autoren die Aminosäurenkonzentration im Plasma bei 13 normalen Patienten nach der TNBS-Methode und durch Ionenaustausch-Chromatographie gemessen und eine gute Übereinstimmung der entsprechenden Werte festgestellt.

Wie die Umsetzung von TNBS mit primären Aminogruppen verläuft, ist nicht bekannt, nur einen Anhalt bietet die Formel 1. Das Reagens ist wasserlöslich und einigermaßen stabil in saurer Lösung (2 - 3 Tage), es reagiert bei einem pH-Wert von 7,5 bis 9,5 und 40°C Temperatur mit primären Aminogruppen ($R-NH_2$) sofort unter Bildung des entsprechenden 2,4,6-Trinitrobenzolderivates, welches orange gefärbt ist. Die Reaktion ist stark pH-abhängig. Je alkalischer die Lösung, um so schneller die Umsetzung. In stark basischer Lösung zersetzen sich jedoch TNBS und dessen Aminosäurenderivate, und diese Spaltprodukte haben eine geringere Lichtabsorption [13]. Durch Ansäuern mit 1normaler Salzsäure entsteht ein stabiles, gelbge-

färbtes Derivat unbekannter Zusammensetzung, dessen Extinktionsmaximum bei 340 mμ liegt [13].



Formel 1
Erklärung siehe Text

Die verschiedenen Aminosäuren ergeben mit TNBS unterschiedliche Extinktionen, den molaren Extinktionskoeffizienten einiger TNBS-Derivate findet man in der folgenden Tabelle 2.

Aminosäure	ϵ	Aminosäure	ϵ
Glycin	1,23	Glutaminsäure	1,34
Alanin	1,22	Cystin/2	1,20
Valin	1,34	Methionin	1,34
Leucin	1,42	Phenylalanin	1,23
Isoleucin	1,46	Tyrosin	1,36
Serin	1,35	Tryptophan	1,18
Threonin	1,34	Histidin	1,33
Asparaginsäure	1,14	Arginin	1,44
Lysin/2	1,25	Mittelwert	1,28
	x 10^{-4}		x 10^{-4}

Tabelle 2
Molare Extinktionskoeffizienten (ϵ) von Aminosäuren (TNBS-Methode): 1 ml der Aminosäurenlösung bekannter Konzentration

wurde mit 1 ml einer 4%igen Natriumbikarbonatlösung und 1 ml einer 0,1%igen TNBS-Lösung versetzt. Nach 2 Stunden bei 40°C wurde 1 ml einer 1-normalen Salzsäurelösung hinzugefügt und die Extinktion E bei einer Wellenlänge von 340 mμ gegen den entsprechenden Leerwert gemessen. Die so bestimmte Farbintensität wurde auf den molaren Extinktionskoeffizienten umgerechnet nach der Formel: $\varepsilon = \frac{E}{c \times d}$,

wobei c = Konzentration der gemessenen Aminosäurenlösung und d = Schichtdicke der Lösung bedeuten.

2. Durchführung der Versuche:

Bei den folgenden Untersuchungen wurde Glycin als Standardaminosäure gewählt. Diese kommt immer und normalerweise in relativ großer Menge im Urin vor [16], ihr molarer Extinktionskoeffizient liegt nahe dem Mittelwert in Tabelle 2, und sie ist verhältnismäßig billig zu erwerben. Der Gehalt des Urins an primären Aminogruppen der Aminosäuren wird in Mikromol (μM) Glycin pro ml Urin angegeben.

a) Manuelle Bestimmungsmethode

Reagenzien:

1. 2, 4, 6-Trinitrobenzolsulfonsäurelösung (TNBS-Lös.), 0,1%ig in 0,01-normaler Salzsäure; die Lösung ist 2 - 3 Tage haltbar.
2. Pufferlösung, pH 9,5.

Eine 0,75-molare Lösung des Natriumsalzes der Phenol-4-Sulfonsäure in destilliertem Wasser wird mit 2-normaler Natronlauge auf den pH-Wert 9,5 eingestellt, der Puffer ist einige Tage brauchbar.

3. 1-normale Salzsäure
4. Glycinstandardlösungen

0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 und 0,6 μM Glycin pro ml destilliertes Wasser, sie sind bei +4°C mehrere Tage haltbar.

Vorgehen:

aa) Herstellung einer Eichkurve

0,6 ml destilliertes Wasser (Leerwert) und jeweils 0,6 ml der Standardlösungen werden mit 1,6 ml Pufferlösung und 0,25 ml TNBS-Lösung versetzt und 10 Minuten in einem Wasserbad von 40°C stehengelassen. Anschließend gibt man zu jeder Probe 0,5 ml einer 1-normalen Salzsäure, mischt und mißt die Extinktion der Standardlösungen gegen den Leerwert bei einer Wellenlänge von 436 nm in einem Filterphotometer (Eppendorf). Diese Wellenlänge wurde im Hinblick auf die halbautomatische Bestim-

mungsmethode der Aminosäuren gewählt. Aus apparativen Gründen sind die bei 340 nm gemessenen Extinktionswerte dabei kleiner als bei 436 nm. Mit den Werten für die Extinktion und die Konzentration der einzelnen Glycinstandardlösungen wird eine Eichprobe angefertigt, Beispiel siehe Abbildung 3.

bb) Urinuntersuchung

Der Urin wird 1:50 mit destilliertem Wasser verdünnt. Dadurch kann die Eigenfarbe des Urins vernachlässigt werden. Das weitere Vorgehen entspricht dem unter aa) beschriebenen, wenn man die Standardlösungen durch die Urinproben ersetzt. mittels der Eichkurve kann m an dann die der gemessenen Extinktion entsprechende Aminosäurenkonzentration im Urin, ausgedrückt in μM Glycin pro ml, direkt angeben.

b) Halbautomatische Bestimmungsmethode

Verwendet wurde das Auto-Analyzer-System der Firma Technicon. Den schematischen Aufbau der Apparatur zeigt die Abbildung 1, die Reagenzien sind dieselben wie unter a) beschrieben.

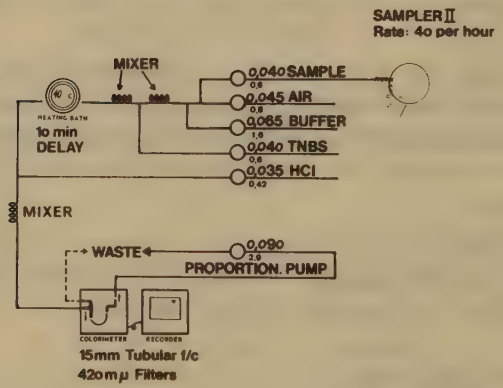


Abbildung 1

Auto-Analyzer-System zur halbautomatischen Bestimmung von Aminosäuren im Urin. Einzelheiten siehe Text. An den zuführenden Schläuchen der Proportionspumpe geben die oberen Zahlen den Schlauchquerschnitt in "inches" an, die unteren die dadurch geförderten cm^3 pro Minute. Beispiel: Sample: Schlauchquerschnitt 0,040 inches, entsprechend 0,6 cm^3 pro Minute Förderleistung.

Die Untersuchung nimmt ihren Ausgang vom Probennehmer (Sampler II), der, je nach Stellung eines Ansaugröhrchens destilliertes Wasser (Leerwert) oder Proben (Sample) in einem zeitlichen Verhältnis von 1:2 bei 40 Proben pro Stunde ansaugt. Die Standardlösungen und der zu untersuchende Urin befinden sich in kleinen Kunststoffbehältern und werden, auf einem Teller kreisförmig angeordnet, nacheinander dem Ansaugröhrchen zugeführt, das zwischenzeitlich immer wieder in destilliertes Wasser (Leerwert) eintaucht. Die angesaugte Flüssigkeit durchläuft nun ein Schlauchsystem. Nach Passieren der Proportionspumpe (Proportioning Pump) wird zunächst Luft (Air) zur Segmentierung des Flüssigkeitsstromes zugeführt. Die Trennluft zwischen den Flüssigkeitssegmenten verhindert eine Ausweitung der Probenzone im Schlauchsystem, vor allem entgegen der Stromrichtung, was entweder zur Störung der nachfolgende Probe führt oder einen langen Waschvorgang (Ansaugen von destilliertem Wasser) nötig macht. Die Konzentration der sich in einem Flüssigkeitssegment befindlichen Reaktionspartner bleibt einigermaßen konstant. Nach der Luft werden der Puffer (Buffer) und die TNBS-Lösung dem Hauptstrom zugeführt. Zwischengeschaltete Mischschlangen (Mixer) sorgen für eine gute Durchmischung der Reaktionspartner, indem die Flüssigkeitssegmente um eine horizontale Achse in vertikaler Ebene kreisen und dadurch die Reaktionslösungen, die verschiedene spezifische Gewichte besitzen, durcheinander wirbeln. Das Verhältnis aller dem Schlauchsystem zugeführten Flüssigkeiten und Gase zueinander wird dadurch festgelegt, daß sie vor dem Mischen einen Schlauch in der Proportionspumpe durchfließen, von dessen Querschnitt es abhängt, wieviel pro Zeiteinheit zugemischt wird. Im Anschluß an die Mischschlangen durchläuft der Hauptstrom 10 Minuten lang eine Verzögerungsschlange in einem Heizbad von 40°C(10 min. Delay), dann kommt die 1-normale Salzsäure hinzu, und schließlich wird nach Abrennung der Luftblasen die Extinktion mittels einer Durchflußkuvette (Schichtdicke 15 mm) in einem Colorimeter bei einer Wellenlänge von 420 nm fortlaufend gemessen. Ein angeschlossener halblogarithmischer Kompensationsschreiber dokumentiert die gemessenen Extinktionswerte, siehe Abbildung 2. Der Abstand der Spitzen der aufgezeichneten Zacken von der geschriebenen Grundlinie gibt die Extinktion der Pro-

ben an, die Breite der Zacken ist abhängig vom Papiervorschub pro Zeiteinheit.

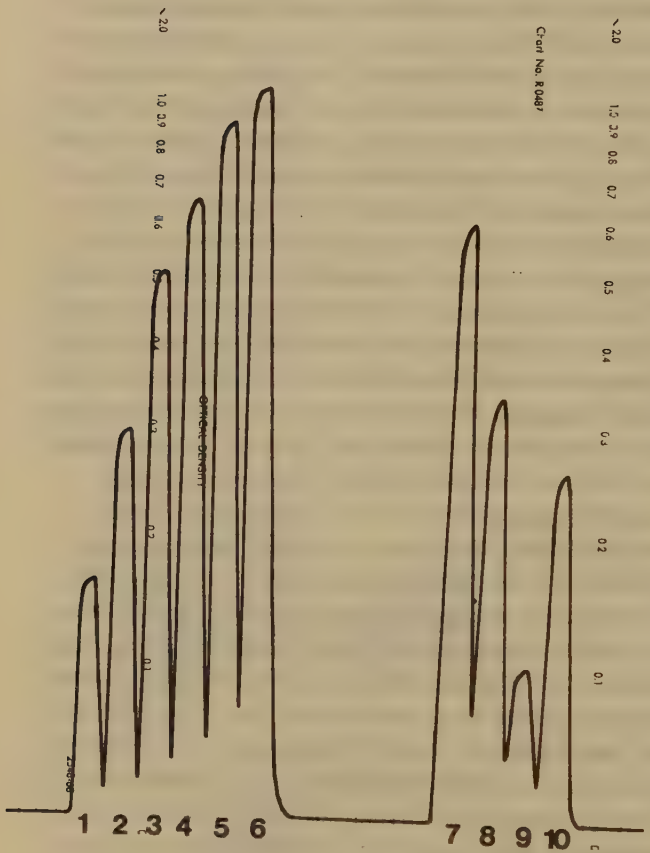


Abbildung 2
Vom Schreiber des Auto-Analyzer-Systems fortlaufend aufgezeichnete Extinktionen von Glycinstandardlösungen und Urinproben, Erklärung siehe Text.

Die ersten 6 Zacken in Abbildung 2 entsprechen der Extinktion der Glycinstandardlösungen von 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 und 0,6 μ M Glycin pro ml destilliertes Wasser, die weiteren Zakken 7 - 10 geben die Extinktionen von Urinproben wieder.

Aus den Werten der gemessenen Extinktionen der Glycinstandardlösungen und den dazugehörenden Konzentrationen wird eine Eichkurve hergestellt, siehe Abbildung 3.

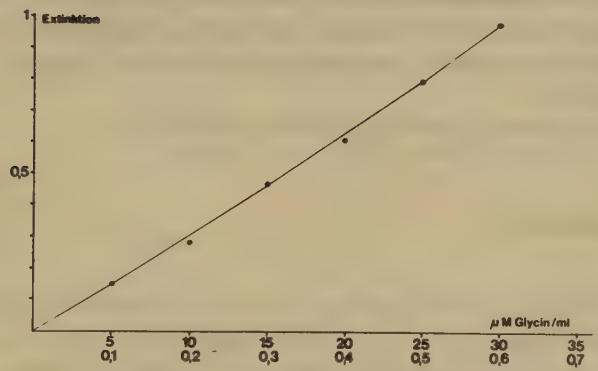


Abbildung 3
Eichkurve zur Bestimmung der Aminosäurenkonzentration im Urin. Die obere Skala der Abszisse gibt die Urinkonzentration in μM Glycin pro ml an, die untere Skala die Glycinkonzentration der Standardlösungen, Erklärung siehe Text.

Auf der Ordinate wird die Extinktion eingetragen, auf der Abszisse die entsprechende Konzentration (untere Skala in Abbildung 3). Mittels paralleler Verschiebung der Koordinatenachsen durch die angegebenen Punkte erhält man 6 Schnittpunkte, die untereinander und mit dem Nullpunkt verbunden werden. Wird auf der Abszisse außerdem das 50fache der Konzentration der Standardlösungen aufgezeichnet (obere Skala in Abbildung 3), so kann man bei der Urinuntersuchung die zur gemessenen Extinktion gehörende Urinkonzentration direkt ablesen (untersucht wird ja ein auf das 50fache verdünnter Urin).

3. Untersuchung der Eignung der TNBS-Methode zur quantitativen Bestimmung der Aminosäurenkonzentration im Urin

Zum Vergleich der TNBS-Methode mit einer manometrischen Methode zur quantitativen Bestimmung von Aminosäuren wurde in 27 verschiedenen Urinproben (24 Stunden-Sammelurine von zwei Kindern; 13 Proben von A.M., ♀ , 7 Jahre alt und 14 Proben von C.M., ♀ , 15 ¼ Jahre alt) jeweils

a) der freie α-Aminostickstoff nach Van SLYKE und Mitarbeitern [8] bestimmt, Angaben in mg pro l. Die Untersuchungen wurden ausgeführt von Dr. TOHJU ICHIMURA, Tokyo.

b) die Konzentration der primären Aminogruppen mit der TNBS-Methode gemessen, angegeben als μM Glycin pro ml Urin, bestimmt. Es sollte festgestellt werden, in welcher Weise die Werte miteinander korrelieren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt:

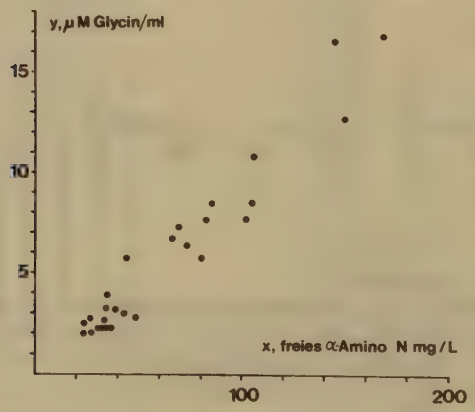


Abbildung 4
Abhängigkeit der Aminosäurenkonzentration (angegeben in μM Glycin pro ml) und des freien α-Aminostickstoffes (angegeben in mg pro l) voneinander in derselben Urinprobe, bestimmt in 27 verschiedenen 24 Stunden-Sammelurinen. Erklärung siehe Text.

Die Regressionsfunktion der abgebildeten Wertepaare kann als linear angesehen werden. Die Schätzung des Korrelationskoeffizienten r, der ein Maß für die Abhängigkeit der beiden Variablen x und y (siehe Abbildung 4) darstellt, erfolgt nach der Formel

$$r = \frac{S(xy) - \bar{x}S(y)}{\sqrt{S(x^2) - \bar{x}S(x) \quad x \quad S(y^2) - \bar{y}(Sy)}}$$

wobei $\bar{x}$ = Mittelwert von x, $\bar{y}$ = Mittelwert von y und S = Summe bedeuten [17].

Die zur Berechnung benutzten Werte können der Tabelle 3 entnommen werden; zur Vereinfachung der Rechenoperation wurden die x- und y-Werte transformiert in x' und y', siehe Tabelle 3.

$$r = \frac{516,82 - 1,315 \times 5,9}{\sqrt{(602,19 - 1,315 \times 35,49) x (491,21 - 0,219 x 5,9)}}$$

$$r = 0,98$$

Die Korrelation von x und y ist eng, dies bedeutet, daß die mit den beiden Methoden gewonnenen Werte nahezu total voneinander abhängig sind. Damit ist bewiesen, daß sich die TNBS-Methode gut eignet zur quantitativen Bestimmung der Aminosäurenkonzentration im Urin.

Kind	24 Std.-Urin vom	x	y	$x' = 1/10(80-x)$	$y' = 6-y$	x'^2	y'^2	$x'y'$
A.M.	10.2.66	43,3	3,0	3,67	3,0	13,45	9,0	11,00
	11.2.66	34,5	2,25	4,55	3,75	20,7	14,05	17,07
geb.	13.2.66	27,7	2,0	5,23	4,0	27,4	16,0	20,9
1.3.	14.2.66	26,9	2,75	5,31	3,25	28,2	10,55	17,25
1959	15.2.66	33,7	2,7	4,63	3,3	21,45	10,9	15,3
	16.2.66	33,1	2,25	4,69	3,75	21,1	14,05	17,6
	17.2.66	30,8	2,25	4,92	3,75	24,2	14,05	21,02
	19.2.66	23,9	2,0	5,61	4,0	31,5	16,0	22,4
	20.2.66	23,7	2,5	5,63	3,5	31,7	12,25	19,7
	22.2.66	48,8	2,75	3,12	3,25	9,72	10,55	10,12
	23.2.66	37,3	2,25	4,27	3,75	18,2	14,05	16,0
	24.2.66	39,6	3,15	4,04	3,85	16,35	14,85	15,55
	25.2.66	35,3	3,25	4,47	3,75	20,0	14,05	16,75
C.M.	24.1.66	74,4	6,4	0,55	- 0,4	0,3	0,16	- 0,22
	25.1.66	149,8	12,7	- 6,98	- 6,7	48,7	44,9	46,8
geb.	26.1.66	105,0	8,5	- 2,5	- 2,5	6,25	6,25	6,25
22.11.	27.1.66	69,4	7,35	1,06	- 1,35	1,12	1,82	- 1,43
1950	28.1.66	106,3	10,8	- 2,63	- 4,8	6,91	23,1	12,6
	29.1.66	82,8	7,6	- 0,28	- 1,65	0,78	2,73	0,46
	30.1.66	197,0	16,5	-11,7	-10,5	137,0	110,0	122,8
	1.2.66	167,6	16,8	- 8,76	-10,8	76,8	116,5	94,5
	2.2.66	44,4	5,75	3,56	0,25	12,65	0,63	0,89
	3.2.66	65,9	6,75	1,41	- 0,75	1,99	0,56	- 1,06
	4.2.66	35,0	3,9	4,5	2,1	20,25	4,31	9,45
	5.2.66	81,0	5,75	- 0,1	0,25	0,01	0,63	- 0,02
	6.2.66	85,6	8,5	- 0,56	- 2,5	0,31	6,25	1,4
	7.2.66	102,7	7,65	- 2,27	- 1,65	5,15	2,72	3,74
S				35,49	5,9	602,19	491,21	516,82

Tabelle 3
x = freier α-Aminostickstoff in mg pro l Urin,
y = Aminosäurenkonzentration in μM Glycin pro ml Urin.
Siehe auch Abbildung 4, Erklärung siehe Text.

4. Bezug der Aminosäurenkonzentration im Urin auf die Kreatininkonzentration

Zur Berechnung der Aminosäurentagesausscheidung M_{As} im Urin muß neben der Aminosäurenkonzentration c_{As} das in 24 Stunden ausgeschiedene Urinvolumen V bekannt sein: $M_{As} = c_{As} \times V$. Das Sammeln des 24 Stunden-Urins ist im Hinblick auf die Anwendung der TNBS-Methode als Screening-Test zu aufwendig. Ist das 24 Stunden-Urinvolumen nicht bekannt, so wird daher zum Vergleich der täglichen renalen Aminosäurenausscheidung verschiedener Individuen von einigen Untersuchern die insgesamt ausgeschiedene Menge auf die tägliche Kreatininausscheidung bezogen [18,19]. Man erhält dann sogenannte Kreatininäquivalente.

Beim gesunden Menschen ist das im Harn ausgeschiedene Kreatinin endogenen Ursprungs. Schwankungen in der Ernährungsweise, solange sie innerhalb normaler Grenzen bleiben, haben keinen nennenswerten Einfluß auf die täglich ausgeschiedene Kreatininmenge [20].

Die Kreatininausscheidung ist jedoch geschlechts- und vor allem altersabhängig, siehe Tabelle 4 nach [21].

	mg/kg Körpermasse x 24 Std.	
Frühgeborene 2 - 12 Wochen	14,3	(8,3 - 19,9)
Reifgeborene 1 - 7 Wochen	13,2	(10,0 - 15,5)
Kinder 2 - 3 Jahre 6 -11 Jahre	12,0 16,3	(6,4 - 21,8)
Mädchen 12 - 17 Jahre	22,8	(12,2 - 29,4)
Jungen 12 - 17 Jahre	25,1	(20,7 - 28,2)
Erwachsene	19,0 - 27,0	(1,0 - 1,5 g pro Tag)

Tabelle 4

Kreatininausscheidung im Urin, Normalwerte (Mittelwert und Normbereich) nach 21).

Unter der Voraussetzung, daß die tägliche Kreatininausscheidung innerhalb einer Altersgruppe einigermaßen konstant ist (K), kann man auf Grund folgender Formeln die Aminosäurenkonzentration auf die Kreatininkonzentration (c_{Kr}) in derselben Urinprobe beziehen:

$$V \times c_{Kr} = K \quad \text{oder} \quad V = \frac{K}{c_{Kr}} ,$$

wobei V das in 24 Stunden ausgeschiedene Urinvolumen bedeutet. Da

$$M_{As} = c_{As} \times V$$

ist (siehe oben), so ergibt sich für

$$M_{As} = c_{As} \times \frac{K}{c_{Kr}} \quad \text{oder} \quad \frac{M_{As}}{K} = \frac{c_{As}}{c_{Kr}} .$$

Die Aminosäurengesamtausscheidung ist also proportional der Aminosäurenkonzentration, bezogen auf die Kreatininkonzentration. Nach neueren Untersuchungen sind die Schwankungen auch innerhalb bestimmter Altersgruppen so groß, daß der Bezug der Aminosäurenausscheidung auf die Kreatininausscheidung nur noch für Screening-Tests geeignet erscheint [22].

5. Quantitative Bestimmung der Kreatininkonzentration im Urin

Einleitung:

Sowohl der manuellen als auch der halbautomatischen Bestimmungsmethode von Kreatinin liegt als Prinzip die Reaktion nach JAFFÉ zugrunde: Kreatinin reduziert eine alkalische Pikrinsäurelösung zu Pikraminsäure, wobei eine gelbrote Farbe auftritt, deren Intensität photometrisch gemessen wird (photometrische Bestimmung nach FOLIN-WU).

Durchführung der Versuche:

a) Manuelle Methode

Da die apparative Ausrüstung zur halbautomatischen Bestimmung bis kurz vor Abschluß der durchgeführten Untersuchungen fehlte, wurden alle in dieser Arbeit genannten Kreatininkonzentrationen manuell bestimmt. Dazu wurde die Biochemica Test-Combination Creatinin der Firma C.F. Boehringer & Söhne GmbH, Mannheim, verwendet, Arbeitsvorschrift siehe Seite 22. Sie sieht

Creatinin

Biochemica Test Combination

Best.-Nr.: 15943
für 30 – 90 Bestimmungen

Konzentration der Lösungen:

1 1 mg Creatinin/100 ml
2 43 mM Pikrinsäure
3 4,1 N Natronlauge

Lösungen

1 Lösung in Flasche 1 unverdünnt verwenden. Flasche verschlossen bei Raumtemperatur aufbewahren. (Ein Jahr haltbar.)

2 Lösung in Flasche 2 unverdünnt verwenden. Flasche verschlossen bei Raumtemperatur aufbewahren. (Ein Jahr haltbar.)

3 Lösung in Flasche 3 unverdünnt verwenden. Flasche verschlossen bei Raumtemperatur aufbewahren. (Ein Jahr haltbar.)

Zusätzlich

Trichloressigsäure, ca. 3,0 N, Best.-Nr.: 15914 oder 245 g Trichloressigsäure, p. a. mit dest. Wasser lösen und auf 500 ml auffüllen.

Bestimmungsansatz

Wellenlänge: 530 – 550 nm (Hg 546 nm)
Glasküvette: 2 cm Schichtdicke
Temperatur: 20 – 25° C
Messung gegen Leerwert.
Für jede Meßreihe genügen ein Leerwert und ein Standardwert.

Kein Plasma, nur frisches und hämolysefreies Serum verwenden.

Harn 1+49 mit dest. Wasser verdünnen, 2 ml dieser Verdünnung zum Test einsetzen.

In 10-ml-Zentrifugenglas pipettieren:			
	Leerwert	Standard	Probe
dest. Wasser	2,0 ml	1,0 ml	2,0 ml
Lösung 1	–	1,0 ml	–
Trichlor-essigsäure	1,0 ml	1,0 ml	2,0 ml
Serum bzw. verd. Harn	–	–	2,0 ml
gut mischen, Niederschlag bei Probe mit Glasstab gut verteilen, 10 min zentrifugieren. Klaren Überstand vorsichtig in trockenes Reagenzglas abgießen, evtl. filtrieren.			
Überstand bzw. Filtrat	obige Lösungen weiterverwenden		3,0 ml
Lösung 2	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
Lösung 3	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
mischen, 15 min bei Raumtemperatur stehen lassen. Extinktion der Probe (E_{Probe}) und Extinktion des Standards ($E_{Standard}$) gegen Leerwert messen.			

Bei Werten über 6 mg Creatinin/100 ml Serum bzw. 300 mg Creatinin/100 ml Harn 0,3 ml Probe mit 2,7 ml Natriumchlorid-Lösung, 0,9-proz. (Best.-Nr.: 15870), mischen und Bestimmung mit 2,0 ml dieser Verdünnung wiederholen (Ergebnis × 10).

Berechnungen

für **Serum:**

$$\frac{E_{Probe}}{E_{Standard}} = \text{mg Creatinin/100 ml Serum}$$

Normalwerte im Serum [1]

für Männer
10 – 60 Jahre (Mittelwert) : 0,6 – 1,1 mg/100 ml

für Frauen:
10 – 60 Jahre (Mittelwert) : 0,5 – 0,9 mg/100 ml

für **Harn:**

$$\frac{E_{Probe}}{E_{Standard}} \cdot 50 = \text{mg Creatinin/100 ml Harn}$$

Normalwerte im Harn [2] : 1 – 1,5 g/24 Std.

für **Creatinin-Clearance** in ml/min:

$$\frac{\text{mg Creatinin/100 ml Harn} \cdot \text{ml Harn in 24 Std.}}{\text{mg Creatinin/100 ml Serum} \cdot 1440}$$

Normalwerte [3]
für Männer : 98 – 156 ml/min
für Frauen : 95 – 160 ml/min

Hinweise

Die Bestimmung ist nicht spezifisch und kann durch Anwesenheit größerer Mengen reduzierender Substanzen gestört werden.
Im Serum treten jedoch bis 300 mg Glucose/100 ml, 100 mg Fructose/100 ml, 10 mg Vitamin C/100 ml, 10 mg Aceton/100 ml und 5 mg Acetacetat/100 ml, im Harn bis zu 5 g Glucose/100 ml, 5 g Fructose/100 ml, 5 g 3-Hydroxybuttersäure/100 ml, 2 g Vitamin C/100 ml, 1,5 g Aceton/100 ml und 0,2 g Acetessigsäure/100 ml keine Störungen auf.

Durch kurzes Aufkochen des Harns kann Eiweiß ausgefällt und durch Filtration entfernt werden, Acetessigsaure wird hierbei zersetzt, während sich Aceton und Schwefelwasserstoff verflüchtigen.

Der dieser Testcombination beiliegende Plastikdorn dient zum Durchstoßen der Verschlußfolien der Plastikflaschen.

Lit.:

Methode: Popper, H. et al., Biochem. Z. **291**, 354 (1937)
1 Schirmeister, J. et al., Dtsch. Med. Wschr. **89**, 1018 (1964)
2 Sarre, H.: Nierenkrankheiten, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1959
3 Schirmeister J. et al., Dtsch. Med. Wschr. **89**, 1640 (1964)

BOEHRINGER MANNHEIM GMBH
Biochemica

1. Auflage 1970
270

vor, daß die 1:50 mit destilliertem Wasser verdünnte und zur Enteiweißung mit einer Trichloressigsäurelösung (und destilliertem Wasser) versetzte Urinprobe zentrifugiert wird. Zentrifugiert wurde aber nur dann, wenn tatsächlich durch die Trichloressigsäure eine Trübung oder ein Niederschlag aufgetreten war (was sehr selten der Fall war), andernfalls wurde der Ansatz sofrt nach Arbeitsvorschrift weiterverwendet.

Diese Methode ist nicht spezifisch und kann durch Anwesenheit größerer Mengen reduzierter Substanzen beeinträchtigt werden. Nach den Angaben der Hersteller der Reagenzien treten im Urin bei Konzentrationen von Glukose bis 5%, Fruktose bis 5%, 3-Hydroxybuttersäure bis 5%, Vitamin C bis 2%, Aceton bis 15% und Acetessigsäure bis 0,2% keine Störungen auf.

b) Halbautomatische Bestimmungsmethode
Es wird das Auto-Analyzer-System der Firma Technicon verwendet. Das von der Firma angegebene Verfahren zur Kreatininbestimmung wurde modifiziert. Da nur Urin untersucht werden sollte, entfiel der Dialysator, der bei der Serum- und Vollblutanalyse zur Abtrennung von Eiweiß bzw. Erythrozyten und Eiweiß notwendig wäre. Die Abbildung 5 gibt den Aufbau der Apparatur schematisch wieder; die methodischen Prinzipien, nach denen ein halbautomatisches System arbeitet, wurden unter Abschnitt B I 2 b ausführlicher beschrieben.

Reagenzien:
1. Gesättigte Pikrinsäurelösung: 13 g Pikrinsäure werden mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und soweit wie möglich gelöst. Anschließend wird filtriert.

2. ½normale Natronlauge

3. Kreatininstandardlösungen von 1, 2, 3, 4, 5 und 6 mg% Kreatinin in ⅒normaler Salzsäure.

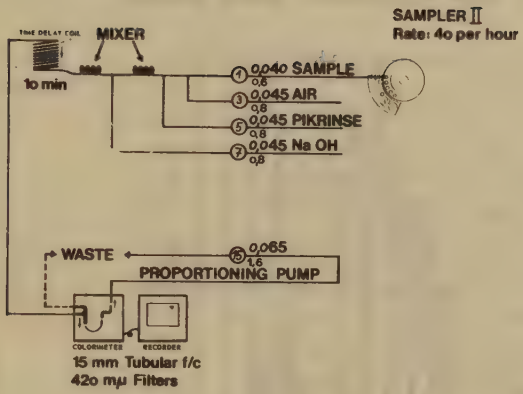


Abbildung 5
Auto-Analyzer-System zur halbautomatischen Kreatininbestimmung. Erklärung siehe Text. An den zuführenden Schläuchen der Proportionspumpe geben die oberen Zahlen den Schlauchquerschnitt in "inches" an, die unteren die Förderleistung in cm^3/Minute. Beispiel: NaOH:Schlauchquerschnitt 0,045 inches, Förderleistung 0,8 cm^3/min.

Vorgang:

Vom Probennehmer (Sampler II, siehe Abbildung 5) werden 40 Proben pro Stunde Kreatininstandardlösungen bzw. Urin, 1:50 verdünnt mit destilliertem Wasser (Sample) angesaugt im Wechsel mit destilliertem Wasser (Leerwert). Der Flüssigkeitsstrom wird nach Durchlaufen der Proportionspumpe mit Luft (Air) segmentiert. Im Anschluß daran werden nun nacheinander die Pikrinsäurelösung und die Natronlauge zugemischt (Mixer). Nach Durchlaufen einer Verzögerungsschlange (Time Delay Coil) für 10 Minuten wird die Extinktion bei einer Wellenlänge von 420 nm fortlaufend mittels einer Durchflußkuvette von 15 mm Schichtdicke in einem Colorimeter gemessen. Ein angeschlossener halblogarithmischer Kompensationsschreiber registriert die gemessenen Werte, siehe Abbildung 6.Die Höhen der ersten 6 Zacken, von der geschriebenen Grundlinie aus gemessen, geben die Extinktionen der Kreatininstandardlösungen wieder.

Die folgenden Zacken (7 - 9) sind Urinbeispiele. Da diese vor der Untersuchung 1:50 mit destilliertem Wasser verdünnt wurden, spielt ihre Eigenfarbe keine Rolle.

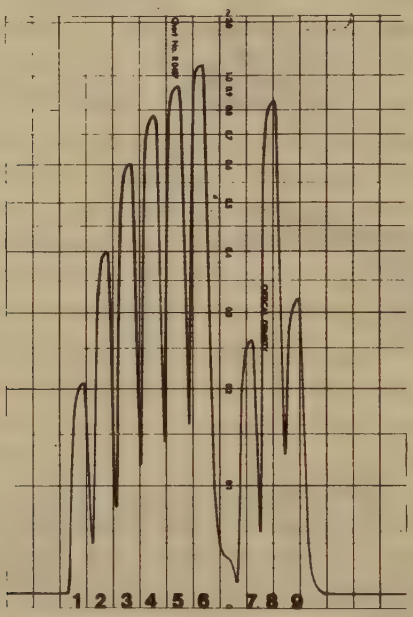


Abbildung 6
Vom Schreiber des Auto-Analyzer-Systems fortlaufend aufgezeichnete Extinktionen von Kreatininstandardlösungen und von Urinen.

aa) Herstellung der Eichkurve
Die Konzentrationen der Kreatininstandardlösungen werden in einem Koordinatensystem auf der Abszisse, die entsprechenden Extinktionswerte auf der Ordinate eingetragen. Mittels Parallelverschiebung der Koordinatenachsen durch die angegebenen Punkte erhält man 6 Schnittpunkte, die angenähert zu einer Geraden verbunden werden können, welche durch den Nullpunkt verläuft, siehe Abbildung 7.

bb) Bestimmung der Kreatininkonzentration im Urin
Wird im Koordinatensystem in Abbildung 7 auf der Abszisse das 50fache der Standardkonzentration eingetragen, so kann

man hier die den gemessenen Extinktionen entsprechende Kreatininkonzentration im Urin direkt ablesen.

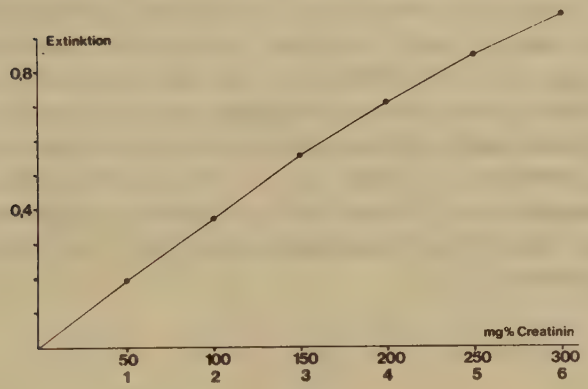


Abbildung 7
Eichkurve zur Bestimmung der Kreatininkonzentration im Urin. Erklärung siehe Text.Die obere Skala der Abszisse gibt die Urinkonzentration, die untere die Konzentration der Standardlösungen in mg% an.

6. Ergebnisse der Bestimmung der Aminosäurenkonzentration im Urin, bezogen auf die Kreatininkonzentration

Insgesamt wurden ca. 480 Urinproben (vorwiegend Morgenurin) von Kindern im Alter von 1 Tag bis zu 17 Jahren, welche in der Universitäts-Kinderklinik und -Poliklinik der Freien Universität Berlin entweder stationär oder ambulant wegen unterschiedlichster Beschwerden und Erkrankungen behandelt wurden, untersucht. Die Patienten wurden zunächst in folgende Altersgruppen eingeteilt: 1 Tag - 8 Wochen, 8 Wochen - 1 Jahr, 1 - 2 Jahre, 2 - 6 Jahre, 6 - 12 Jahre und 12 - 17 Jahre; dadurch sollte der altersabhängigen Kreatininausscheidung Rechnung getragen werden, siehe Tabelle 4. Die Aminosäuren- und die entsprechende Kreatininkonzentration der untersuchten Urinproben einer Altersgruppe wurden in ein Koordinatensystem eingetragen, wobei auf der Abszisse die Kreatininkonzentration, auf der Ordinate die Glycinkonzentration abgelesen wird,

entsprechend den Abbildungen 8 - 11. Da ca. 20% der Werte von der Punktwolke beträchtlich nach oben und ca. 10% der Werte auffällig nach unten abwichen, wurden diese als von der Norm abweichend angesehen. Die übrigen Werte wurden nach der Kreatininkonzentration in Gruppen, jeweils ansteigend um 10 bzw. 20 mg% Kreatinin, eingeteilt. Innerhalb einer Gruppe wurde der Medianwert der Aminosäurenkonzentration ermittelt. Sein Abstand vom obersten und untersten Wert gibt die Spannweite an. Da in den Altersklassen 1 Tag - 8 Wochen, 8 Wochen - 1 Jahr und 1 - 2 Jahre die Medianwerte und Spannweiten nicht wesentlich voneinander abwichen, wurden sie zu einer Gruppe zusammengefaßt, die in Abbildung 8 dargestellt wird:

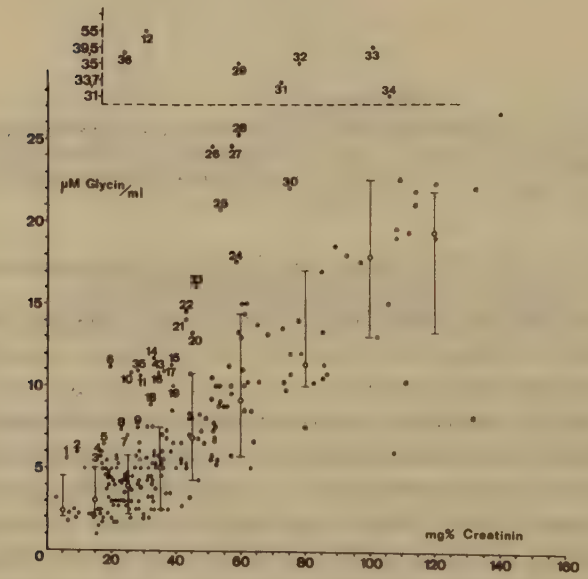


Abbildung 8
Aminosäurenkonzentration im Urin, bezogen auf die Kreatininkonzentration bei Kindern bis zu 2 Jahren. Erklärung siehe Text.

Die analog gewonnenen Medianwerte und Spannweiten der Altersgruppe 2 - 6 Jahre gibt die Abbildung 9 wieder:

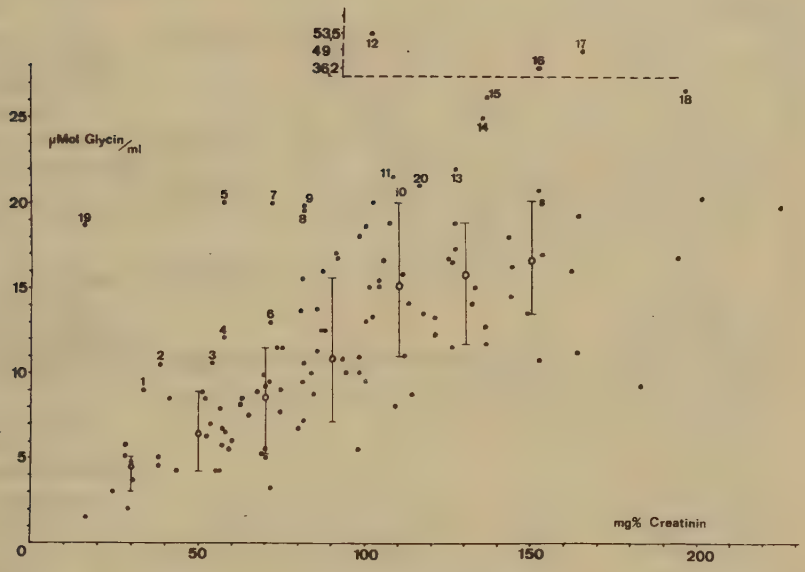


Abbildung 9
Aminosäurenkonzentration im Urin, bezogen auf die Kreatininkonzentration, bei Kindern im Alter von 2 - 6 Jahren, Erklärung siehe Text.

Die Altersgruppen 6 - 12 Jahre und 12 - 17 Jahre konnten auf Grund übereinstimmender Medianwerte und Spannweiten ebenfalls zusammengelegt werden, siehe Abbildung 10.

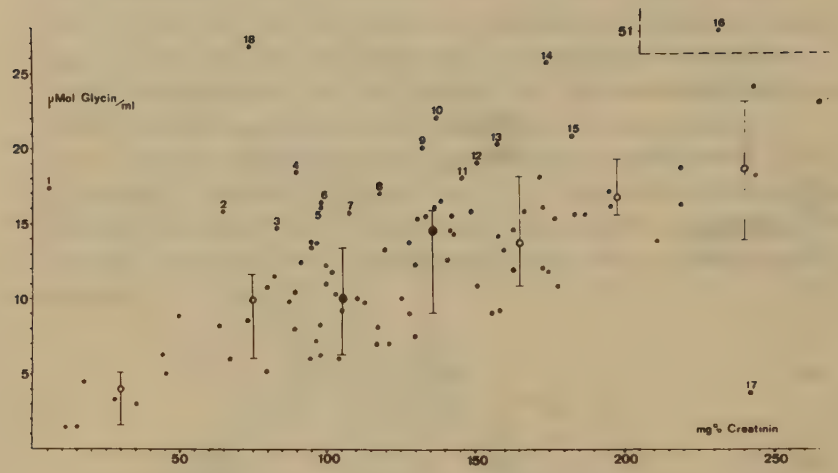


Abbildung 10
Aminosäurenkonzentration im Urin, bezogen auf die Kreatininkonzentration, bei 6 - 17 Jahre alten Kindern.

Vergleicht man die Verbindungslinien der Medianwerte in Abbildung 8, 9 und 10 miteinander, so erkennt man, daß die Steigung mit fortschreitendem Alter abnimmt. Werden die Kinder älter, so können (innerhalb der Spannweiten) zunehmend höhere Kreatininkonzentrationen bestimmt werden (die Punktwolken rücken nach rechts, siehe Abbildung 8 - 10), die Aminosäurenkonzentration steigt in Relation zur Kreatininkonzentration aber langsamer an. Deshalb ist die oben beschriebene Bildung von Altersgruppen notwendig, z.B. Nr. 7 in Abbildung 10 wäre in Abbildung 8 "normal". Die nach oben von den Spannweiten abweichenden Aminosäurenkonzentrationen für die drei genannten Altersklassen sind in den folgenden Tabellen 5 - 7 aufgeführt, wobei Tab. 5 zu Abb. 8, Tab. 6 zu Abb. 9 und Tab. 7 zu Abb. 10 gehören.

Nr[1]	Name, Alter[2] Diagnose	Erstbestimmung Datum	µM Glycin pro ml Urin	mg% Kreatinin	1. Kontrolle Datum	µM Glycin pro ml Urin	mg% Kreatinin	Nr[1]
1	F.H., ♂, 8 Mo beiderseitiges subdurales Haematom	6. 5.68	5,6	6				
2	Z.T., ♀, 6 Mo hochfieberhafter Infekt und Dyspepsie	13. 6.68	6,1	9,5				
3	W.D., ♀, 8 Mo Pleuropneumonie	11.10.68	5,8	16,3				
4	S.A., ♀, 3 Mo eitrige Meningitis	21.10.68	7,0	25,0	7.11.68	6,0	17,1	7
5	P.H., ♂, 17 Tage untergewichtig. Reifgeborenes s. auch Chromatogramm Nr.1	19.12.67	6,5	17,3				
6	H.A., ♂, 2 Mo fieberhafter Infekt bei Phenylketonurie	15. 5.68	11,2	19,4	29. 5.68	5,5	30,0	
7	1. Kontrolle von Nr. 4							
8	W.S., ♂, 2½ Mo Pneumonie	19. 9.68	7,4	22,9				
9	T.S., ♀, 3 Mo Rauchvergiftung	10.10.68	7,5	27,9	14.10.68	5,25	22,1	
10	S.P., ♂, $1^8/12$ J Dystrophie s. auch Chromatogramm Nr.2	10. 9.68	10,8	26,1	5.11.68	3,0	21,4	
11	M.K., ♂, 5 Mo Commotio cerebri	23. 9.68	10,6	28,4				
12	B.C., ♂, 2 Mo unstillbares Erbrechen, Dyspepsie	6.11.68	55,0	30,0	21.11.68	11,3	33,0	13
	2. Kontrolle: s. auch Chromatogramm Nr.3	7.12.68	10,9	28,0				35
13	1. Kontrolle von Nr. 12							
14	T.F., ♂, 10 Mo Pyurie	14. 5.68	11,7	33,0				

Nr[1]	Name, Alter[2] Diagnose	Erstbestimmung Datum	µM Glycin pro ml Urin	mg% Kreatinin	1. Kontrolle Datum	µM Glycin pro ml Urin	mg% Kreatinin	Nr
15	R.S.,♀,4 Tage Asphyxie, Nephropathie der Mutter, Forcepsentbindung	21.10.68	11,3	38,5	31.10.68	4,3	35,0	
16	A.L.,♂,4 Mo Dyspepsie	11.11.68	10,8	34,3	18.11.68	5,75	32,8	
17	S.M.,♂,14 Tage multiple Mißbildungen s. auch Chromatogramm Nr.4	9. 9.68	10,9	35,8				
18	M.C.,♂,1 Mo Pyurie	15. 5.68	8,9	31,8	14. 6.68	3,1	24,3	
19	G.K.,♀,6 Tage Asphyxie bei Mongolismus	12.11.68	14,5	42,8	6.12.68	10,0	39,0	22
20	B.S.,♂,4 Mo Pertussis	9.10.68	13,3	45,0	29.10.68	4,7	36,4	
21	P.C.,♂,1 7/12 J Gastroenteritis	16. 5.68	14,1	43,2				
22	1. Kontrolle von Nr. 19							
23	M.A.,♀,2 Mo Dyspepsie	24.10.68	16,0	46,2	8.11.68	4,25	22,8	
24	R.C.,♀,3 Tage Analatresie 1. postop. Tag	8.11.68	17,5	58,8				
25	B.C.,♀,12 Mo Pertussis bei Krampfleiden s. auch Chromatogramm Nr.5	30. 5.68	20,7	53,5	4. 6.68	33,7	71,6	31
26	F.L.,♂,3/2 Mo Gallengangshypoplasie, Leberschaden	8.10.68	24,5	51,2	17.10.68	35,0	57,5	29
27	D.I-D.,♀,1 Wo Atemnotsyndrom Hyaline Membranen	14.10.68	24,5	56,5	28.10.68	5,75	27,5	
28	W.A.,♂,10 Tage Duodenalstenose 5. postop. Tag	14.10.68	25,2	58,8	17.10.68	4,75	18,8	
29	1. Kontrolle von Nr. 26							

r[1]	Name, Alter[2] Diagnose	Erstbestimmung Datum	µM Glycin pro ml Urin	mg% Kreatinin	1. Kontrolle Datum	µM Glycin pro ml Urin	mg% Kreatinin	Nr[1]
0	M.C., ♀, 8 Mo Megacolon cong., postop.	9.10.68	22,0	75,0	22.10.68	10,1	44,2	
1	1. Kontrolle von Nr. 25							
2	S.M., ♂, 9 Mo floride Rachitis	5.11.68	35,0	55,7				
3	U.J., ♂, 6 Wo Sepsis	11.11.68	39,5	100,0				
4	M.H., ♂, $1^3/12$ J Schädelfraktur	23.10.68	31,0	105,0	7.10.68	5,0	42,8	
5	2. Kontrolle von Nr. 12							
6	B.N., ♂, 2 Mo Galaktosämie	6.12.68	36,0	24,0				

.) Nr. in Abbildung 8
) Alter bei Erstbestimmung

Tabelle 5
n Abbildung 8 dargestellte Fälle von "Hyperaminoazidurie"
Nr. 1 - 36) bei Kindern bis zu 2 Jahren.

Nr[1]	Name, Alter[2] Diagnose	Erstbestimmung Datum	µM Glycin pro ml Urin	mg% Kreatinin	1. Kontrolle Datum	µM Glycin pro ml Urin	mg% Kreatinin	Nr
1	G.D., ♀, 2^{10}/12J Pneumonie	15. 8.68	9,0	33,9				
2	S.T., ♂, 3^{7}/12 J Osteomyelitis	6. 5.68	10,6	38,5				
3	S.S., ♀, 3^{9}/12 J Minderwuchs s. auch Chromatogramm Nr.6	1. 7.68	10,6	54,2				
4	G.W., ♂, 2½ J Pyurie nach Blasensteinentfernung s. auch Chromatogramm Nr.7	5. 5.68	12,1	57,7	24. 5.68	8,9	51,1	
5	O.E., ♂, 2 J floride Rachitis s. auch Chromatogramm Nr.8	19. 8.68	20,0	57,7				
6	S.S., ♂, 5½12 J Scharlach	17.11.68	13,0	71,4	28.11.68	8,0	64,2	
7	M.S., ♀, 5^{4}/12J Nephrolithiasis s. auch Chromatogramm Nr.9	9. 5.68	20,0	72,0				
8	V.T., ♂, 6½ J metatrophischer Zwergwuchs s. auch Chromatogramm Nr.10	14. 8.68	19,6	81,3				
9	B.D., ♂, 3 J Angina follicularis, spast. Bronchitis	5.11.68	19,8	81,4	12.11.68	4,1	49,7	
10	M.E., ♀, 5 J Angina lacunaris	26. 9.68	21,0	108,0				
11	G.Y., ♀, 2^{9}/12J Pertussis	11.10.68	21,5	108,0	31.10.68	9,2	72,0	
12	S.H., ♂, 2^{5}/12J eitrige Influenzameningitis	8.11.68	53,5	102,0	2.12.68	12,9	149,0	
13	J.Y., ♀, 2^{7}/12J Gastroenteritis	28. 9.68	22,0	127,0				

Nr[1]	Name, Alter[2] Diagnose	Erstbestimmung Datum	µM Glycin pro ml Urin	mg% Kreatinin	1. Kontrolle Datum	µM Glycin pro ml Urin	mg% Kreatinin	Nr[1]
4	S.C., ♀, 2 J Bronchopneumonie	11.10.68	25,0	134,8				
5	T.A., ♀, 2 8/12 J Osteomyelitis	22.10.68	26,3	136,5	13.11.68	10,4	93,0	
6	1. Kontrolle von Nr. 17							
7	K.M., ♀, 2½ J Diphtherie	28.10.68	49,0	165,0	7.11.68	36,2	152,0	16
8	S.S., ♀, 3 7/12 J Enterocolitis	24. 9.68	26,7	196,0				
9	B.B., ♂, 5 J Leucinose	31.12.68	18,7	16,0				
0	W.B., ♂, 3 J Homocystinurie	28.11.68	21,0	114,0				
1	W.F., ♂, 5½ J Nephrose (9,4‰ Esbach)	25.11.68	22,5	25,5				

.) Nr. in Abbildung 9
?) Alter bei Erstbestimmung

Tabelle 6
n Abbildung 9 dargestellte Fälle von "Hyperaminoazidurie"
(Nr. 1 - 21) bei 2 - 6 Jahre alten Kindern.

Nr[1]	Name, Alter[2] Diagnose	Erstbestimmung Datum	µM Glycin pro ml Urin	mg% Kreatinin	1. Kontrolle Datum	µM Glycin pro ml Urin	mg% Kreatinin	Nr
1	D.J., ♂, 7 J Nephrose (7,4‰ Esbach)	25. 7.68	17,4	6,0				
2	K.D., ♀, $6^{3}/4$J Kachexie s. auch Chromatogramm Nr.11	11. 4.68	15,8	65,2				
3	1. Kontrolle von Nr. 4							
4	K.S., ♀, $8^{11}/12$J Verhaltensstörungen Weitere Kontrollen waren nicht möglich	9. 5.68	18,4	90,2	28.10.68	14,75	83,6	3
5	W.H., ♂, $14^{3}/4$J Hyperthyreose	16. 5.68	16,1	98,0				
6	B.M., ♂, 8½ J acetonämisches Erbrechen	12.11.68	16,3	98,6	18.11.68	9,3	151,0	
7	V.D., ♂, 14 J Pyurie	9. 5.68	15,7	108,0	22. 5.68	7,5	85,0	
8	S.W., ♂, 6 J Asthma bronchale	30. 9.68	17,0	118,0				
9	D.H., ♂, $7^{8}/12$J Scharlach	17. 9.68	20,0	132,5				
10	L.M., ♀, $6^{5}/12$J Asthma bronchiale	14.10.68	22,0	137,0				
11	B.D., ♂, $11^{2}/12$J psychogene Schluckstörungen	18.10.68	18,0	146,0	25.10.68	8,9	127,0	
12	K.M., ♀, 10½J Herzfehler mit Cyanose	8.10.68	19,0	151,0				
13	B.T., ♀, $9^{2}/12$J Pneumonie	8.10.68	20,2	158,0				
14	W.A., ♂, $6^{9}/12$J hochfieberhafte Angina und Pansinusitis	14.10.68	25,5	174,0				
15	L.A., ♂, $7^{1}/12$J Mumps-Meningitis	14.10.68	20,7	183,0				

Nr[1]	Name, Alter[2] Diagnose	Erstbestimmung Datum	µM Gly- cin pro ml Urin	mg% Krea- tinin	1. Kontrolle Datum	µM Gly- cin pro ml Urin	mg% Krea- tinin	Nr[1]
16	R.R., ♂, 11[8]/12J Mumps-Meningitis	11.11.68	53,0	231,0	28.11.68	10,2	147,0	
17	S.R., ♀, 14 J Anorexia nervosa	9. 5.68	3,7	245,0	14. 6.68	7,0	111,0	
18	P.P., ♀, 9 J Cystinurie	4.12.68	26,7	74,0				

1) Nr. in Abbildung 10
2) Alter bei Erstbestimmung

Tabelle 7

In Abbildung 10 die obere Spannweite der Aminosäurenkonzentrationen überschreitende Fälle bei Kindern im Alter von 6 - 17 Jahren; Nr. 17 zeigt eine auffällige Abweichung nach unten.

Eine besondere Gruppe stellen die Frühgeborenen dar, bei 8 Untersuchungen wurde eine Abweichung nach oben festgestellt: B.M., ♂, 1 Monat alt, geboren im Schwangerschaftsmonat VIII - IX, siehe 1 in Abbildung 11. Alle untersuchten Frühgeborenen waren klinisch gesund, bei B.M. wurde der Befund einer Hyperaminoazidurie erhoben, nachdem das Kind schon entlassen war. Die Eltern kamen der wiederholten Bitte, Urin vom Kind zu sammeln, nicht nach, deshalb konnten Kontrolluntersuchungen und weitergehende Analysen des Urins nicht durchgeführt werden, die relative Hyperaminoazidurie blieb ungeklärt.

7. Diskussion der Ergebnisse

In den Tabellen 5 - 7 wurde in der Regel die Entlassungsdiagnose der Erkrankung eingesetzt oder, falls die Untersuchungen noch nicht abgeschlossen waren, die Verdachtsdiagnose. Wenn möglich, wurde von demselben Patienten nach einiger Zeit eine zweite und dritte Untersuchung der Aminosäurenausscheidung durchgeführt. Dabei waren allerdings folgende Schwierigkeiten zu überwinden:

1. der Patient war zwischenzeitlich entlassen worden,
2. die Eltern leisteten der Bitte, vom entlassenen Kind Urin für eine Kontrolluntersuchung zu gewinnen, nicht Folge.

Auf eine Wiederholungsuntersuchung wurde deswegen bisher dann verzichtet, wenn das Kind vor der genannten Erkrankung gesund

war, gesund entlassen wurde und die Hyperaminoazidurie als vorübergehende durch das Krankheitsbild erklärt werden konnte, siehe A IV. Neuerdings ist die Klinik apparativ so gut ausgerüstet, daß bei auffälligen Erstbefunden vor der Entlassung der Kinder in jedem Falle mehrere Kontrolluntersuchungen durchgeführt werden können.

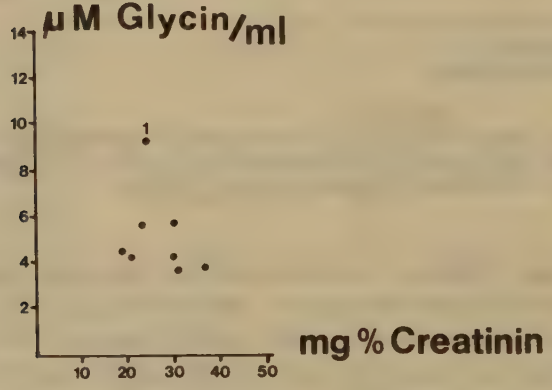


Abbildung 11
Aminosäurenkonzentration im Urin, bezogen auf die Kreatininkonzentration, bei Frühgeborenen. Erklärung siehe Text.

Bei den in den Abbildungen 8 - 10 und den entsprechenden Tabellen 5 - 7 angegebenen Fällen von angeborenen Stoffwechselkrankheiten war die Diagnose schon vor der Untersuchung des Urins mit der TNBS-Methode bekannt:

1. Abb. 8 und Tab. 5: Nr. 6 fieberhafter Infekt bei Phenylketonurie
2. Abb. 8 und Tab. 5: Nr. 36 Galaktosämie
3. Abb. 9 und Tab. 6: Nr. 19 Leucinose
4. Abb. 9 und Tab. 6: Nr. 20 Homocystinurie
5. Abb. 10 und Tab. 7: Nr. 18 Cystinurie

Bei einem zweiten an Phenylketonurie erkrankten unbehandelten Kind, H.F., ♂, $4^{8}/12$ Jahre alt, wich die Aminosäurenkonzentration (20,8 µM Glycin/ml Urin) bezogen auf die Kreatininkonzentration (152 mg%) nicht von dem in Abbildung 9

ermittelten Normalkollektiv ab. Dieses war zu erwarten, da bei dieser Erkrankung keine Hyperaminoazidurie erheblichen Ausmaßes auftritt. Das in Abbildung 8 und Tabelle 5 unter Nr. 6 aufgeführte Kind mit Phenylketonurie war diätetisch eingestellt. Es hatte zum Zeitpunkt der Urinerstuntersuchung einen fieberhaften Infekt, der auf unbekannte Art und Weise die Hyperaminoazidurie ausgelöst hatte. Eine Kontrolle zu einem späteren Zeitpunkt, nach Abklingen des Infektes, ergab eine normale Aminosäurenausscheidung: bei 30 mg% Kreatinin wurden 5,5 µM Glycin bestimmt.

Bei den untersuchten Fällen von Galaktosämie, Leucinose und Cystinurie wichen die Aminosäurenkonzentrationen, angegeben in µM Glycin/Ml Urin und bezogen auf die Kreatininkonzentration, erheblich nach oben vom angegebenen Normalkollektiv der entsprechenden Altersgruppe ab. Bei der Homocystinurie war dies weniger ausgeprägt, was nicht überrascht, da nur Homocystin stark vermehrt im Urin ausgeschieden wird [23]. Die in der Literatur angegebenen Mengen des ausgeschiedenen Homocystins (bis 80 mg in 24 Std.) [24] lassen vermuten, daß in der Regel bei der Bestimmung der Gesamtaminosäurenausscheidung bei Vorliegen einer Homocystinurie keine pathologischen Werte zu erwarten sind, da die ausgeschiedenen Mengen zu klein sind, um sich bei den normalerweise stark schwankenden Werten der Aminosäurengesamtausscheidung bemerkbar zu machen. Sehr viel besser geeignet zur Aufdeckung einer Homocystinurie ist die unten beschriebene Methode zur Bestimmung der SH-Gruppen- und S-S-Brückenhaltigen Aminosäuren.

Ob die TNBS-Methode sich dazu eignet, Erkrankungsfälle von M. WILSON aufzudecken, konnte nicht geklärt werden, da kein Urin eines solchen Falles vorlag, aber die in der Literatur angegebenen Mengen der täglich ausgeschiedenen Aminosäuren [25] lassen dies sehr wahrscheinlich werden.

Wurde eine Hyperaminoazidurie festgestellt und bestand auf Grund der Symptomatik des Krankheitsbildes der Verdacht, eine angeborene Stoffwechselkrankheit könne vorliegen, so wurde eine Analyse der im 24Stunden-Sammelurin ausgeschiedenen Aminosäuren mit Hilfe der Säulenchromatographie durch-

geführt. Die Chromatogramme wurden analysiert von Dr. med. Eberhard MÖNCH, Oberarzt an der Universitäts-Kinderklinik der Freien Universität Berlin:

Nr. 1

P.H., ♂, 17 Tage alt, untergewichtiges Reifgeborenes, siehe Tabelle 5:
Es liegen keine Besonderheiten vor.

Nr. 2

S.P., ♂, $1^{8}/12$ Jahre alt, Dystrophie, siehe Tabelle 5:
Einige Aminosäuren, insbesondere Taurin und Alanin, liegen an der oberen Grenze der Norm. Rückschlüsse auf das Vorliegen einer angeborenen Stoffwechselkrankheit lassen sich nicht ziehen.

Nr. 3

B.C., ♂, 2 Monate alt, unstillbares Erbrechen, Dyspepsie, siehe Tabelle 5:
Es fällt eine relativ hohe Cystinausscheidung auf, Lysin, Arginin und Ornithin liegen im Normbereich. Dieser Befund spricht ebenso wie das Krankheitsbild gegen das Vorliegen einer Cystinurie.

Nr. 4

S.M., ♂, 14 Tage alt, multiple Mißbildungen, siehe Tabelle 5:
Generalisierte leichte Hyperaminoazidurie.

Nr. 5

B.C., ♀, 12 Monate alt, Pertussis bei Krampfleiden, siehe Tabelle 5:
Lysin, Tyrosin und Cystin treten vermehrt auf, deutliche Ausscheidung von Homocystin.

Nr. 6

S.S., ♀, $3^{3}/4$ Jahre alt, Minderwuchs, siehe Tabelle 6:
Beurteilung von insgesamt 4 Chromatogrammen:
Die Aminosäurenausscheidung befindet sich an der oberen Grenze der Norm, mit Ausnahme von Glycin, welches um 50% über der Norm liegt. Da keine Glucosurie festgestellt wurde, kann es sich um eine heterozygote Form der Glycinurie handeln oder um eine Erkrankung mit Begleitglycinurie mäßigen Grades. Steine der ableitenden Harnwege waren nicht nachweisbar.

Nr. 7
G.W., ♂, 2½ Jahre, Pyurie nach Blasensteinentfernung, siehe Tabelle 6:
Leichte generalisierte Aminoazidurie.

Nr. 8
O.E., ♂, 2 Jahre, floride Rachitis, siehe Tabelle 6:
Generalisierte Aminoazidurie.

Nr. 9
M.S., ♀, 5 4/12 Jahre, Nephrolithiasis, siehe Tabelle 6:
Leichte generalisierte Aminoazidurie.

Nr. 10
V.T., ♂, 6½ Jahre, metatrophischer Zwergwuchs, siehe Tabelle 6:
Erhebliche Ausscheidung einer noch nicht geklärten Ninhydrin-positiven Substanz.

Nr. 11
K.D., ♀, 6 3/4 Jahre, Kachexie, siehe Tabelle 7:
Relative Vermehrung von Glycin, Cystin, Glutaminsäure und Asparaginsäure.

Durch die in den Abbildungen 8 - 10 dargestellten Untersuchungen wurden also keine neuen Erkrankungsfälle von "häufigeren" angeborenen Stoffwechselkrankheiten, die in der Tabelle 1 aufgeführt sind, entdeckt; die angegebenen Fälle waren schon vorher bekannt. Die hierbei festgestellten Aminosäurenkonzentrationen im Urin weichen so stark nach oben vom angenommenen Normalkollektiv der entsprechenden Altersgruppe ab, daß die ermittelten Spannweiten eng genug gefaßt erscheinen zur Aufdeckung von massiven Hyperaminoazidurien, die auf einer Stoffwechselstörung beruhen.

In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob die aus Aminosäuren aufgebauten höhermolekularen Substanzen (Peptide, Albumine, Proteine) einen wesentlichen Einfluß auf die mit der TNBS-Methode bestimmten Aminosäurenkonzentrationen im Urin haben. Diese wurde deshalb vor und nach Enteiweißung mit Trichloressigsäure bestimmt. Der Unterschied betrug in Urinen, bei denen die Sulfosalizylsäureprobe auf Eiweiß ne-

gativ war, weniger als 5%, mit zunehmender Albuminurie nimmt diese Differenz zu. Bei einem Kind beispielsweise, das an einem nephrotischen Syndrom litt und eine Proteinurie von 9,4‰ Esbach aufwies, wurde im nichtenteiweißten Urin eine Aminosäurenkonzentration von 22,5 µM Glycin pro ml bei einer Kreatininkonzentration von 25,5 mg% bestimmt (Nr. 21 in Tabelle 6, W.F., ♂, 5½ Jahre).

Nach Enteiweißung mit Trichloressigsäure betrug die Aminosäurenkonzentration (unter Berücksichtigung der aufgetretenen Verdünnung) 18,8 µM Glycin pro ml, der Unterschied machte in diesem Falle 16,5% aus, aber auch nach Entfernung der Eiweißkörper war die Aminosäurenkonzentration immer noch stark erhöht.

Wird mit der TNBS-Methode eine Hyperaminoazidurie festgestellt, so empfiehlt sich folgendes Vorgehen zur weiteren Abklärung:

1. Möglichst mehrere Wiederholungsuntersuchungen im Verlauf der nächsten Tage und Wochen. Dabei kann festgestellt werden, ob eine permanente Hyperaminoazidurie vorliegt, die auf eine angeborene Stoffwechselkrankheit hinweisen kann, oder ob die Hyperaminoazidurie abklingt, was für ein Krankheitsbild sprechen kann, das nicht auf einer angeborenen Stoffwechselstörung beruht.

2. Testung des Urins auf Eiweiß, eine massive Proteinurie kann u.a. auf ein nephrotisches Syndrom deuten.
3. Weitere klinische Untersuchungen zur Abklärung des Krankheitsbildes.
4. Bei Vorliegen einer Symptomatik, die für eine angeborene Stoffwechselkrankheit spricht, ist eine weitergehende chromatographische Analyse des Urins angebracht. Es ist geplant, zunächst eine Dünnschichtchromatographie durchzuführen. Bringt diese keine Klärung, so soll die aufwendigere Säulenchromatographie angewendet werden. Diese wurde bisher bei verdächtigen Befunden gleich eingesetzt, da eine geeignete Methode der Dünnschichtchromatographie noch nicht zur Verfügung steht.

II. Quantitative Bestimmung der Konzentration von SH-Gruppen- und S-S-Brücken-haltigen Aminosäuren im Urin

1. Einleitung:

Das Verfahren wird angewendet als Screening-Test auf Cystinurie und Homocystinurie im Hinblick auf eine frühzeitige Behandlung, die bei diesen Krankheiten Erfolg verspricht [26].

Bei der Cystinurie handelt es sich um eine angeborene Störung des Transportsystems für die Aminosäuren Cystin, Lysin, Arginin und Ornithin. Diese werden in der Niere vermindert aus dem Primärharn resorbiert und erscheinen deshalb vermehrt im Urin. Die normale Cystinausscheidung beträgt bei Kindern, Jugendlichen und Erwachsenen 40 - 80 mg/g Kreatinin, das entspricht 160 - 320 µM/g Kreatinin [27]. Werden mehr als 250 mg Cystin pro g Kreatinin ausgeschieden, so kommt es zur Ausbildung von Cystinsteinen in den ableitenden Harnwegen [27]. Diese umfassen nach vielen Untersuchungen z.B. nach MÖRNER [28] ungefähr 1% aller Steine der ableitenden Harnwege. Im Falle einer Cystinsteinbildung können bis zu 800 mg Cystin/g Kreatinin im Urin bestimmt werden [27]. Nach Untersuchungen von LEWIS [29] findet man bei einer Person unter 250 eine erhöhte Cystinausscheidung, und bei einer Person unter 2500 kommt es zu einer Kristallisation von Cystin im Harntrakt. Demnach kann man in Westberlin beispielsweise bei einer jährlichen Geburtenzahl von etwa 25000 mit 100 Neugeborenen rechnen, die Cystinvermehrt ausscheiden. Von diesen wären 10 Kinder in Gefahr, an einer Nephrolithiasis durch Cystinsteine zu erkranken.

Eine frühzeitige Behandlung zur Vermeidung der Konkrementbildung besteht darin, beim Patienten besonders in der Nacht für ein großes Urinvolumen zu sorgen, in welchem das ausgeschiedene Cystin gelöst bleibt. Der pH-Wert des Urins soll im alkalischen Bereich liegen, da dann das Cystin besser löslich ist. Außerdem kann man cystinarme Diät verordnen (Präparate der Maizena-Werke).

Der Homocystinurie liegt eine Aminosäurenstoffwechselstörung zugrunde: die von der Cystathioninsynthetase katalysierte Umwandlung von Homocystein zu Cystathionin mittels Anlage-

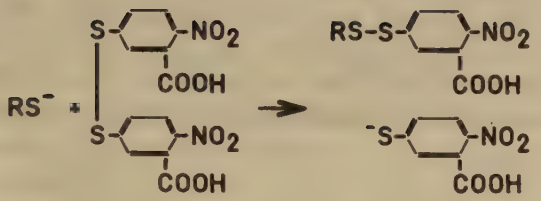
rung von Serin ist blockiert. Das Krankheitsbild ist charakterisiert durch geistige Retardierung, Linsenektopie, epileptiforme Krampfanfälle, feines trockenes Haar, thromboembolische Vorgänge (mögliche Todesursache) und ausgeprägte Homocystinurie. Bei einem 7jährigen kranken Jungen wurden beispielsweise 70 - 80 mg oder 260 - 300 µM in 24Std. nachgewiesen [30].

Über die Häufigkeit der Homocystinurie lassen sich keine Aussagen machen, da eine systematische Suche nach Erkrankungsfällen in größerem Umfang bisher noch nicht durchgeführt wurde. GERRITTSEN und WAISMAN [31] geben 19 bekannte Fälle in Irland, England und den USA an. Die Therapie besteht in einer frühzeitigen Einschränkung der Methioninzufuhr in der Nahrung (Präparate der Maizena-Werke).

Die folgenden Untersuchungen wurden durchgeführt mit dem Ziel, eine einfache colorimetrische Methode zur quantitativen und spezifischen Bestimmung der Aminosäuren mit SH-Gruppen (Cystein, Homocystein) und S-S-Brücken (Cystin, Homocystin und gemischte Disulfide) im Urin zu finden. Sie soll eine halbautomatische Anwendung zulassen. Bei der bisher gebräuchlichen colorimetrischen Methode zur Cystein- und Cystinbestimmung nach SULLIVAN [32] entsteht ein wenig stabiler Farbstoff, außerdem geht Homocystin nur teilweise in die Reaktion ein.

2. Methodik

ELLMAN [33] hat eine gebräuchliche Methode zur manuellen colorimetrischen Bestimmung von SH-Gruppen in biologischen Flüssigkeiten entwickelt. Er wies auf die Möglichkeit der Urinuntersuchung hin. Das wasserlösliche aromatische Disulfid 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoesäure), siehe I in Formel 2, im folgenden DTNB genannt, reagiert mit aliphatischen SH-Verbindungen ($R\text{-}S^-$) bei pH 8,0; dabei bildet es pro Mol SH-Gruppen ein Mol para-Nitrobenzoesäure-Anion, siehe II in Formel 2. Da dieses Anion intensiv orangegelb gefärbt ist, eignet es sich gut zur colorimetrischen Bestimmung von SH-Gruppen.



I II

Formel 2
Erklärung siehe Text

Im Urin kommen die SH-Gruppen-haltigen Aminosäuren in der oxydierten Form Cystin und Homocystin vor. Damit diese nach der Methode von ELLMAN bestimmt werden können, müssen sie zunächst zu Cystein bzw. Homocystein reduziert werden. SULLIVAN et al [32] benutzen als Reduktionsmittel in Anlehnung an PULEWKA und WINZER [34] Natriumcyanid, dieses reagiert nach der Formel 3:

R-S-S-R + NaCN = R-SNa + R-SCN

wobei pro Mol Cystin oder Homocystin ein Mol Cystein bzw. Homocystein freigesetzt wird. Es ist zu erwarten, daß Cystein, Cystin, Homocystein und Homocystin im Urin nach Vorbehandlung mit NaCN äquimolekular mit DTNB reagieren.
Unter Verwendung der in Abschnitt II 3a angegebenen Reagenzien Phosphatpuffer, DTNB-Lösung und Natriumcyanidlösung wurden folgende Proben angesetzt: 0,6 ml destilliertes Wasser (Leerwert) und jeweils 0,6 ml einer Cystein-, Cystin- und Homocystinlösung gleicher Konzentration (1 μM pro ml) wurden mit 0,3 ml NaCN-Lösung versetzt. Nach 10 Minuten wurden zu jeder Probe 2,9 ml Phosphatpuffer und 0,8 ml DTNB-

Lösung hinzugefügt und gemischt. Nach weiteren 3 Minuten wurde dann ein Spektrophotogramm (mit dem Spectrophotometer SP 700 der Leitz-Unicam Instruments Limited) angefertigt. Das Ergebnis gibt die Kurve I in Abbildung 12 wieder: die Spektrophotogramme von Cystein, Cystin und Homocystin weichen nur unwesentlich in der Höhe der Extinktion voneinander ab (unter 5%). Ebenso liegt das Maximum ihrer Extinktion bei der gleichen Wellenlänge (412 nm), was nach der Formel 2 zu erwarten ist; denn in jedem Fall ist die Freisetzung der para-Nitrothiobenzoesäure-Anionen entscheidend.

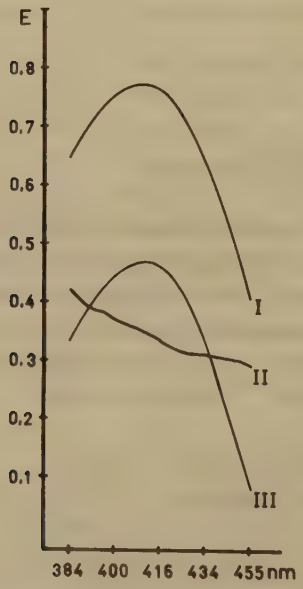


Abbildung 12
Spektrophotogramm einer Cystein-, Cystin- oder Homocystinlösung (I), eines Urins mit starker Eigenfarbe (II) und einer DTNB-Lösung, der eine NaCN-Lösung zugesetzt wurde (III), weitere Erklärung siehe Text.

Kurve II in Abbildung 12 gibt das typische Spektrophoto-

gramm eines Urins wieder, der eine sehr starke Eigenfärbung aufweist.

Gibt man die NaCN-Lösung zur DTNB-Lösung, so wird eine bestimmte Menge para-Nitrothiobenzoesäure-Anionen freigesetzt. Bei weiterer Zugabe von NaCN-Lösung bleibt ab einer bestimmten NaCN-Konzentration in der Mischung die Extinktion im wesentlichen gleich, das Spektrophotogramm einer solchen Mischung ist die Kurve III in Abbildung 12.

3. Durchführung der SH-Gruppen-Bestimmung

a) Manuelle Bestimmungsmethode

Reagenzien:

1. Phosphatpuffer, 0,25 molar, pH = 7,0. 60,8 ml einer 0,25 molaren Kaliumdihydrogenphosphatlösung werden mit 39,2 ml einer 0,25 molaren Dinatriumhydrogenphosphatlösung zu 100 ml ergänzt.
2. 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)-Lösung, 0,4 x 10^{-2} molar. 15,856 mg DTNB werden in 100 cm^3 des 0,25 molaren Phosphatpuffers vom pH = 7,0 gelöst. Bei +4°C aufbewahrt ist die Lösung 2 Wochen haltbar.
3. Natriumcyanid-Lösung, 1 molar in destilliertem Wasser, sie wurde jeden Tag neu angesetzt.
4. Cystin-Standardlösungen: 0,25, 0,5, 0,75 und 1,0 μM Cystin pro ml destilliertes Wasser, ca. 1 Woche haltbar bei +4°C.

Vorgehen:

aa) Herstellung der Eichkurve

0,6 ml destilliertes Wasser (Leerwert) und 0,6 ml der Standardlösungen werden jeweils mit 0,3 ml NaCN-Lösung versetzt und 10 Minuten stehen gelassen. Dann gibt man zu jeder Probe 2,9 ml Phosphatpuffer und 0,8 ml DTNB-Lösung hinzu. Nach dem Mischen läßt man die Ansätze 3 Minuten stehen und mißt dann die Extinktion der Standardlösungen bei einer Wellenlänge von 405 nm gegen den Leerwert in einem Filterphotometer (Eppendorf). Aus den Werten für die Extinktion und die Konzentration der einzelnen Cystinstandardlösungen wird eine Eichkurve angefertigt, Beispiel siehe Abbildung 15.

bb) Untersuchung der Urinprobe

NaCN reagiert in wässriger Lösung stark alkalisch. Wird dem

zu untersuchenden Urin zur Reduktion der Disulfide NaCN zugesetzt, so wird seine Wasserstoffionenkonzentration reduziert, wodurch in der Regel ein Niederschlag auftritt. Da dieser vor allem im Schlauchsystem des Auto-Analyzers erheblich die Genauigkeit der Analyse stört, wird er am besten vor der Untersuchung entfernt. Dazu wird der Urin 1:1 mit 0,1normal NaOH versetzt. Der auftretende Niederschlag wird entweder durch Zentrifugieren entfernt oder dadurch, daß man ihn sedimentieren läßt und den Überstand weiterverwendet.

1. Bestimmung der Extinktion der SH-Gruppen des Urins
Das weitere Vorgehen entspricht dem eben unter "Herstellung der Eichkurve" beschriebenen, wenn man die Standardlösungen durch die Urinproben ersetzt.

2. Ermittlung der Extinktion der Eigenfarbe des Urins
Zu 0,6 ml destilliertem Wasser (Leerwert) bzw. Urin werden 0,3 ml NaCN-Lösung hinzugefügt. Nach 10 Minuten gibt man in jede Probe 3,7 ml Phosphatpuffer und mißt die Extinktion.

Die Differenz der unter 1. und 2. gemessenen Extinktionswerte entspricht der Extinktion der SH-Gruppen. Der Eichkurve kann nun die dazugehörige Konzentration in μM pro ml Urin entnommen werden.

b) Halbautomatische Bestimmungsmethode
Es wurde das Auto-Analyzer-System der Firma Technicon verwendet [35]. In Ermangelung von genügend Originalgeräten diente als Colorimeter ein Eppendorf-Photometer mit Durchflußkuvette, die Extinktion wurde fortlaufend durch einen Eppendorf-Schreiber registriert, den schematischen Aufbau der Apparatur zeigt die Abbildung 13.

Die Reagenzien sind die gleichen wie die unter a) beschriebenen. Die Prinzipien, die der automatischen Bestimmung zugrundeliegen, wurden am Beispiel der Aminosäurenbestimmung unter I b näher erläutert.

40 Proben pro Stunde werden im Wechsel mit destilliertem Wasser (Leerwerte) durch einen Probennehmer (Sampler II) angesaugt. Nach Durchlaufen der Proportionspumpe (Proportioning Pump) wird der Flüssigkeitsstrom mit Stickstoff (N_2) segmen-

tiert (würde Luft benutzt, so bestände die Gefahr der Oxydation der freigesetzten SH-Gruppen). Anschließend wird NaCN-Lösung zugemischt (Mixer) und nach 10 Minuten (Time Delay Coil) werden Pufferlösung (Buffer) und DTNB-Lösung dem Hauptstrom zugeführt. Nach 3 Minuten (Time Delay) wird die Extinktion mittels Durchflußkuvette im Eppendorf-Photometer mit angeschlossenem Schreiber fortlaufend gemessen (Filter 405 nm, Schichtdicke 1 cm).

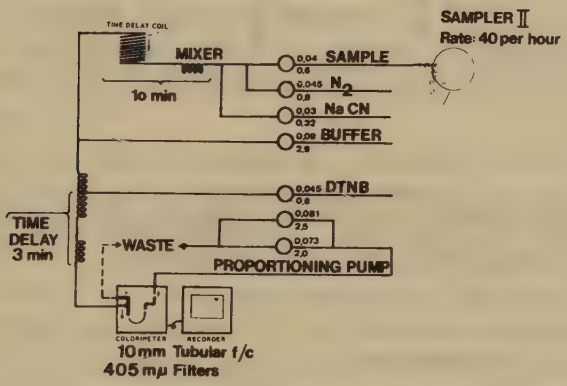


Abbildung 13
Auto-Analyzer-System zur Bestimmung von SH-Gruppen- und S-S-Brücken-haltigen Aminosäuren. Die oberen Zahlen an den Zuführungsschläuchen der Proportionspumpe geben den Schlauchquerschnitt in "inches" an, die unteren Zahlen die Förderleistung in cm^3/min. Beispiel: DTNB: Schlauchquerschnitt 0,045 inches, gefördert werden 0,8 cm^3/min.

In Abbildung 14 entspricht die Höhe der geschriebenen Zacken 1 - 4 der Extinktion der Eichlösungen mit 1/4, 1/2, 3/4 und 1 μM Cystin pro ml destilliertes Wasser. Extinktion und Konzentration der einzelnen Löaungen werden in ein Koordinatensystem eingetragen, siehe Abbildung 15. Die Verbindung der 4 Meßpunkte mit dem Nullpunkt ergibt die Eichkurve, siehe Abbildung 15.

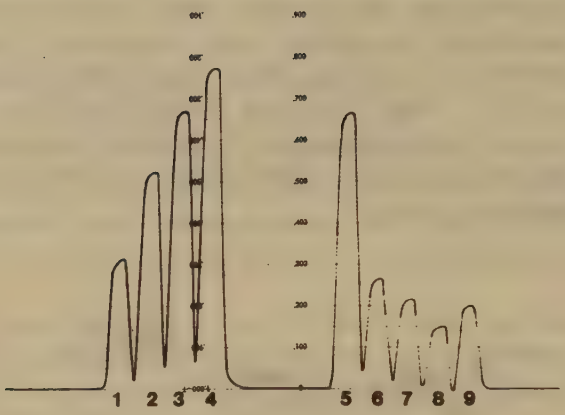


Abbildung 14
Fortlaufend registrierte Extinktionen der Cystin-Standard-lösungen (1 - 4), des Urins eines Kindes mit Homocystinurie (5) und einiger Urine von gesunden Kindern.

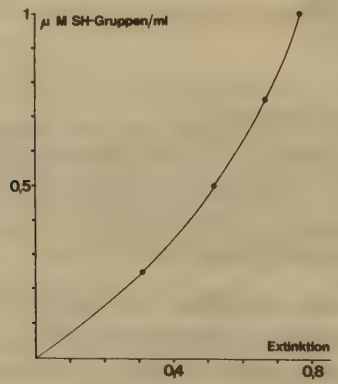


Abbildung 15
Eichkurve zur Bestimmung der SH-Gruppenkonzentration im Urin.

Die Zacke 5 in Abbildung 14 entspricht der Extinktion des Urins eines Kindes mit Homocystinurie, die weiteren Zacken (6 - 9) wurden von normalen Urinen gewonnen. Bei den Urinzacken ist die Extinktion der Eigenfarbe der Urine noch nicht berücksichtigt. Dazu wird ihre Extinktion ein zweites Mal, nachdem die DTNB-Lösung durch Pufferlösung ersetzt wurde, mittels Auto-Analyzer gemessen. Die Extinktion der zu bestimmenden SH-Gruppen ist gleich der Differenz der beiden aufgezeichneten Zacken eines jeden einzelnen Urines: Extinktion (SH-Gruppen + Eigenfarbe) - Extinktion Eigenfarbe. Auf der Eichkurve kann die Konzentration der SH-Gruppen in μM/ml Urin, die ihrer Extinktion entspricht, abgelesen werden. Da der Urin vor der Untersuchung 1:1 verdünnt wurde, ist die doppelte Konzentration an SH-Gruppen die gesuchte Konzentration.

4. Ergebnisse der Bestimmung der Konzentrationen der SH-Gruppen- und S-S-Brücken-haltigen Aminosäuren, bezogen auf die Kreatinin-Konzentrationen

Von ca. 600 Kindern im Alter von 1 Tag bis zu 17 Jahren wurde eine Urinportion (vorwiegend Morgenurin) mit Hilfe des Auto-Analyzer-Systems untersucht. Die gemessene Konzentration der SH-Gruppen (pro S-S-Brücke wird nur eine SH-Gruppe freigesetzt) wurde auf die Kreatininkonzentration in derselben Probe bezogen.

Bei der Untersuchung der Gesamtaminosäurenausscheidung in bezug auf die Kreatininkonzentration im Urin konnte festgestellt werden, daß Medianwerte und Spannweiten verschiedener Altersgruppen nicht übereinstimmen, siehe Abbildung 8 - 10. Deshalb wurden auch bei der Untersuchung der SH-Gruppenausscheidung folgende Altersgruppen gebildet:

bis 2 Jahre alt	siehe Abbildung 16
2 - 6 Jahre alt	siehe Abbildung 17
6 -17 Jahre alt	siehe Abbildung 18
Frühgeborene	siehe Abbildung 19

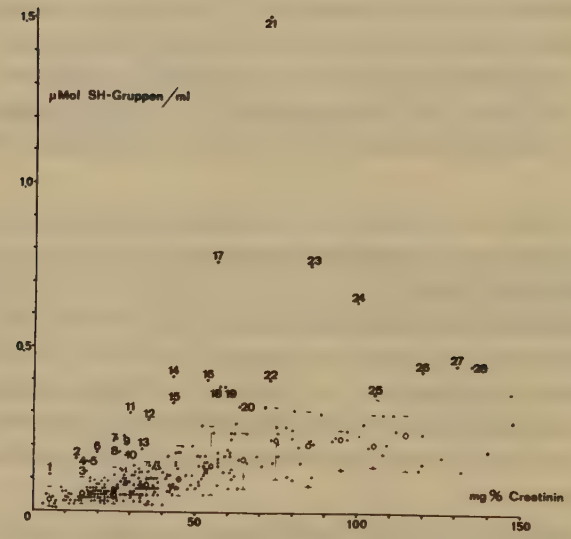


Abbildung 16
SH-Gruppenkonzentration im Urin, bezogen auf die Kreatininkonzentration, bei bis zu 2 Jahre alten Kindern.

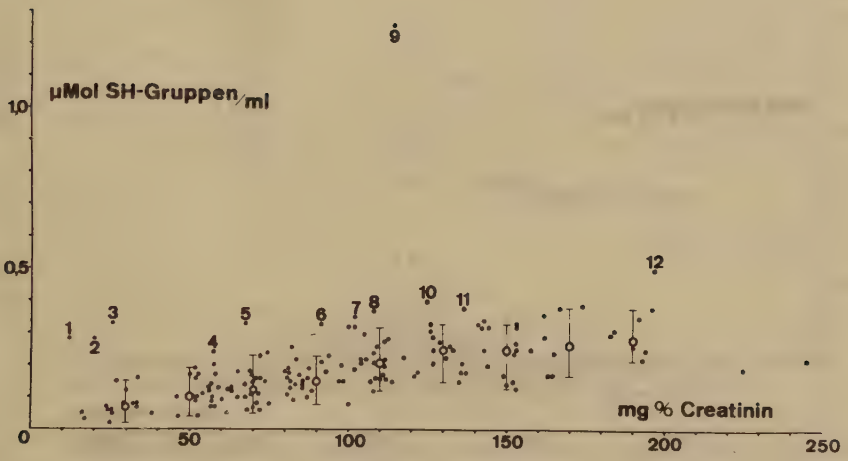


Abbildung 17
SH-Gruppenkonzentration im Urin, bezogen auf die Kreatininkonzentration, bei Kindern im Alter von 2 - 6 Jahren.

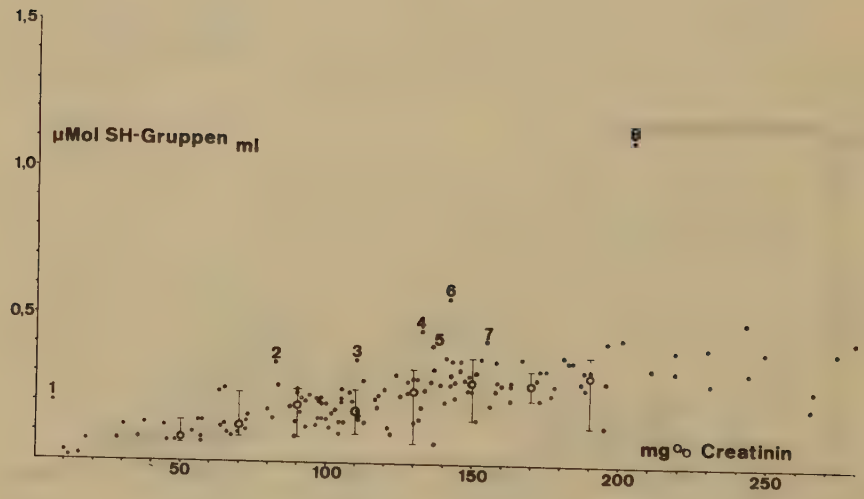


Abbildung 18
SH-Gruppenkonzentration im Urin, bezogen auf die Kreatininkonzentration, bei 6 - 17 Jahre alten Kindern.

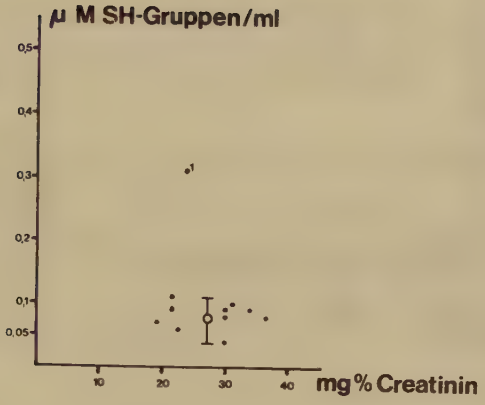


Abbildung 19
SH-Gruppenkonzentration im Urin, bezogen auf die Kreatininkonzentration, bei Frühgeborenen.

Da 10% der Werte erheblich nach oben von der Punktwolke abwichen, wurden sie als nicht der Norm entsprechend angesehen. Die übrigen Werte wurden nach der Kreatininkonzentration in Gruppen, jeweils um 10 oder 20 mg% Kreatinin ansteigend, eingeteilt. Innerhalb der Gruppen wurde der Medianwert der SH-Gruppenkonzentration aufgesucht, sein Abstand vom obersten und untersten Wert gibt die Spannweite an.

Tabelle 8 gibt die in Abbildung 16, Tabelle 9 die in Abbildung 17 und Tabelle 10 die in Abbildung 18 die Spannweiten nach oben überschreitenden Werte an.

Nr[1]	Name, Alter[2] Diagnose	Erstbestimmung Datum	µM SH-Gruppen pro ml Urin	mg% Kreatinin	Nr[1]	1. Kontrolle Datum	µM SH-Gruppen pro ml Urin	mg% Kreatinin
1	J.M., ♂, 2 Mo Guerin-Stern Syndrom	13. 6.68	0,11	5,0				
2	S.A., ♂, 3 Mo Invagination	13. 6.68	0,16	13,2				
3	H.N., ♀, 4 Wo Hydrocephalus Weitere Kontrollen waren nicht möglich	2.10.68	0,12	16,7	6	11.10.68	0,18	19,3
4	W.D., ♀, 8 Mo Pleuropneumonie	11.10.68	0,15	16,3		21.10.68	0,07	19,5
	Nach der TNBS-Methode lag auch Hyperaminoazidurie vor, siehe Nr. 3 in Abbildung 8 und Tabelle 5.							
5	G.M., ♂, 4 Tage Atemnotsyndrom, hyaline Membranen	31.10.68	0,15	17,1		18.11.68	0,06	21,1
6	1. Kontrolle von Nr. 3							
7	B.S., ♂, 4 Wo Pneumonie	25. 9.68	0,22	25,5				
8	T.S., ♂, 3 Mo Rauchvergiftung	9.10.68	0,18	26,7	9	10.10.68	0,23	27,9
	2. Kontrolle:	28.10.68	0,14	31,0				
	Nach der TNBS-Methode lag auch Hyperaminoazidurie vor, siehe Nr. 9 in Abbildung 8 und Tabelle 5							
9	1. Kontrolle von Nr. 8							
10	B.M., ♀, 7 Tage Pyodermien	22.10.68	0,17	28,7		30.10.68	0,08	34,0
11	B.C., ♂, 2 Mo unstillbares Erbrechen, Dyspepsie	6.11.68	0,30	30,0				
	siehe auch Chromatogramm Nr. 1; nach der TNBS-Methode lag auch Hyperaminoazidurie vor, siehe Nr. 12, 13 in Abbildung 8 und Tabelle 5.							
12	V.N., ♂, 5 Tage Atemnotsyndrom, hyaline Membranen	7.10.68	0,28	35,4	13	21.10.68	0,19	33,7
	2. Kontrolle:	30.10.68	0,09	29,5				
13	1. Kontrolle von Nr. 12							

Name, Alter[2] Diagnose	Erstbestimmung Datum	µM SH-Grup- pen pro ml Urin	mg% Krea- tinin	Nr[1]	1. Kontrolle Datum	µM SH-Grup- pen pro ml Urin	mg% Krea- tinin
G.K., ♀, 6 Tage Asphyxie bei Mongolismus	12.11.68	0,41	42,8				
Nach der TNBS-Methode lag auch Hyperaminoazidurie vor, siehe Nr. 19 in Abbildung 8 und Tabelle 5							
F.L., ♂, 4 Mo Gallengangs- hypoplasie, Leberschaden	8.10.68	0,33	42,8	18	17.10.68	0,38	57,5
Nach der TNBS-Methode lag auch Hyperaminoazidurie vor, siehe Nr. 26, 29 in Abbildung 8 und Tabelle 5.							
1. Kontrolle von Nr. 21							
D.I., ♀, 1 Wo Atemnotsyndrom, hyaline Membranen	14.10.68	0,76	56,5		28.10.68	0,125	27,5
Nach der TNBS-Methode lag auch Hyperaminoazidurie vor, siehe Nr. 27 in Abbildung 8 und Tabelle 5.							
1. Kontrolle von Nr. 15							
W.A., ♂, 10 Tage Duodenalstenose 5. postop. Tag	14.10.68	0,38	58,8		17.10.68	0,09	18,8
Nach der TNBS-Methode lag auch Hyperaminoazidurie vor, siehe Nr. 28 in Abbildung 8 und Tabelle 5.							
T.H., ♀, 4 Tage Melaena neona- torum	23. 9.68	0,32	63,5		4.10.68	0,05	25,5
B.C., ♀, 12 Mo Pertussis bei Krampfleiden	8. 5.68	1,5	72,0	16	25. 7.68	0,40	53,5
Siehe auch Chromatogramm Nr. 2; nach der TNBS-Methode lag auch Hyperaminoazidurie vor, siehe Nr. 25 in Abbildung 8 und Tabelle 5.							
D.C., ♂, 3 Wo Cystennieren	11.11.68	0,40	72,8				
G.M., ♀, 15 Tage Duodenalstenose 3. postop. Tag	17.11.68	0,75	85,7		23.11.68	0,10	35,0
U.J., ♂, 6 Wo Ileus, verstor- ben (Sepsis)	11.11.68	0,64	100,0				
Nach der TNBS-Methode lag auch Hyperaminoazidurie vor, siehe Nr. 33 in Abbildung 8 und Tabelle 5.							
G.S., ♂, $1^2/12$ J Praetoxikose	24. 9.68	0,36	105,5		5.10.68	0,06	22,0

Nr[1]	Name, Alter[2] Diagnose	Erstbestimmung Datum	µM SH-Gruppen pro ml Urin	mg% Kreatinin	1. Kontrolle Nr[1]	Datum	µM SH-Gruppen pro ml Urin	mg% Kreatinin
26	S.M., ♂, 2 J Bronchitis bei cerebral. Anfallsleiden Siehe auch Chromatogramm Nr. 3	8.10.68	0,43	120,0				
27	S.A., ♀, 9 Mo Hasenscharte, 2. postop. Tag	23. 4.68	0,45	130,5				
28	B.S., ♂, 13 Mo hochfieberhafter Infekt, Angina lacunaris	20. 9.68	0,45	135,0		28. 9.68	0,11	86,0

1) Nr. in Abbildung 16
2) Alter bei Erstbestimmung

Tabelle 8
Kinder bis zum Alter von 2 Jahren, bei denen eine erhöhte SH-Gruppenausscheidung im Urin festgestellt wurde.

Name, Alter[2] Diagnose	Erstbestimmung Datum	µM SH-Gruppen pro ml Urin	mg% Kreatinin	1. Kontrolle Datum	µM SH-Gruppen pro ml Urin	mg% Kreatinin
P.L., ♂, 4[8]/12 J Scharlach	29. 9.68	0,28	12,1	12.10.68	0,16	71,0
B.B., ♂, 5 J Leucinose	28.11.68	0,28	20,0			
Nach der TNBS-Methode lag auch Hyperaminoazidurie vor, siehe Nr. 19 in Abbildung 9 und Tabelle 6.						
W.F., ♂, 5 ½ J Nephrose (9,4 ‰ Esbach)	25.11.68	0,33	25,5			
Nach der TNBS-Methode lag auch Hyperaminoazidurie vor, siehe Nr. 21 in Abbildung 9 und Tabelle 6						
O.E., ♀, 2[2]/12 J floride Rachitis	19. 8.68	0,24	57,6			
Nach der TNBS-Methode lag auch Hyperaminoazidurie vor, siehe Nr. 5 in Abbildung 9 und Tabelle 6.						
S.C., ♀, 2 J Bronchopneumonie	11.10.68	0,33	67,4	17.10.68	0,12	56,0
Nach der TNBS-Methode lag auch Hyperaminoazidurie vor, siehe Nr. 14 in Abbildung 9 und Tabelle 6.						
K.T., ♀, 2[10]/12 J ausgedehnte Verbrennung	23.10.68	0,33	91,3	8.11.68	0,14	85,5
W.B., ♀, 5 J Meningiosis leukemica	10.10.68	0,35	102,0			
M.E., ♀, 5 J Angina lacunaris	26. 9.68	0,37	108,0	5.11.68	0,22	105,5
Nach der TNBS-Methode lag auch Hyperaminoazidurie vor, siehe Nr. 10 in Abbildung 9 und Tabelle 6.						
W.B., ♀, 3 J Homocystinurie	28.11.68	1,26	114,0			
Nach der TNBS-Methode lag auch Hyperaminoazidurie vor, siehe Nr. 20 in Abbildung 9 und Tabelle 6.						
E.S., ♀, 4 J Scharlach	29.10.68	0,4	125,0	5.11.68	0,29	127,0
T.A., ♀, 2[8]/12 J Osteomyelitis	17.10.68	0,38	136,5	27.10.68	0,17	111,0
Nach der TNBS-Methode lag auch Hyperaminoazidurie vor, siehe Nr. 15 in Abbildung 9 und Tabelle 6.						
P.M., ♂, 4[9]/12 J Verdacht auf Nierensteine nicht bestätigt	29.10.68	0,5	197,0	8.11.68	0,25	194,0

Nr. in Abbildung 17
Alter bei Erstbestimmung

Tabelle 9

nder im Alter von 2 - 6Jahren, bei denen eine vermehrte SH-Grup-
nausscheidung im Urin festgestellt wurde.

Nr[1]	Name, Alter[2] Diagnose	Erstbestimmung Datum	µM SH-Gruppen pro ml Urin	mg% Kreatinin	1. Kontrolle Datum	µM SH-Gruppen pro ml Urin	mg% Kreatinin
1	D.J., ♂, 7 J Nephrose (7,4 °/oo Esbach) Nach der TNBS-Methode lag auch Hyperaminoazidurie vor, siehe Nr. 1 in Abbildung 10 und Tabelle 7.	25. 7.68	0,2	6,0	26. 9.68	0,32	244,0
2	W.J., ♂, 7 5/12 J Gastroenteritis	1.10.68	0,34	82,3	5.10.68	0,16	73,0
3	S.S., ♀, 7 2/12 J Enteritis	23. 4.68	0,35	110,5			
4	F.S., ♀, 7 J Rachitis	5. 2.68	0,45	133	19. 4.68	0,15	81,4
5	S.B., ♀, 12 1/2 J Nebenpocken in der Scheide	17.10.68	0,4	136,5	25.10.68	0,36	141
6	B.M., ♂, 8 1/2 J acetonemisches Erbrechen Nach der TNBS-Methode lag auch Hyperaminoazidurie vor, siehe Nr. 6 in Abbildung 10 und Tabelle 7.	26. 9.68	0,56	142	7.10.68	0,18	110,5
7	K.F., ♂, 8 J Nephrose Esbach: Bodensatz	8. 5.68	0,42	155	13. 6.68	0,35	147,5
8	P.P., ♀, 9 J Cystinurie Nach der TNBS-Methode lag auch Hyperaminoazidurie vor, siehe Nr. 18 in Abbildung 10 und Tabelle 7.	2. 5.68	1,1	204			

1) Nr. in Abbildung 18
2) Alter bei Erstbestimmung

Tabelle 10
Kinder im Alter von 6 - 17 Jahren, bei denen eine erhöhte SH-Gruppenausscheidung im Urin festgestellt wurde.

In der Gruppe der Frühgeborenen wurde bei 8 Untersuchungen in einem Fall eine relativ vermehrte Aminosäurenausscheidung festgestellt: B.M., ♂, 1 Monat alt, geboren im VIII. - IX. Schwangerschaftsmonat, siehe Nr. 1 in Abbildung 19. Bei demselben Kind war schon eine erhöhte Gesamtaminosäurenausscheidung im Urin gefunden worden, siehe Nr. 1 in Abbildung 11.
Leider war das Kind bei Bekanntwerden dieser Befunde entlassen, und die Eltern bemühten sich angeblich wiederholt ohne Erfolg um Urin für eine Kontrolluntersuchung. Dieses Kind war wie alle untersuchten Frühgeborenen klinisch gesund, die Ursache seiner Hyperaminoazidurie blieb leider ungeklärt.

In den Tabellen 8 - 10 wurde in der Regel die Entlassungsdiagnose eingesetzt, andernfalls die Verdachtsdiagnose. War eine erhöhte SH-Gruppenausscheidung gefunden worden, so wurde eine Kontrolluntersuchung durchgeführt. In einigen Fällen war aber das Kind zwischenzeitlich entlassen worden, und die Eltern leisteten der Bitte, Urin für weitere Untersuchungen zu gewinnen, nicht Folge. Bestand der Verdacht auf das Vorliegen einer angeborenen Stoffwechselkrankheit, so wurden die Aminosäuren des Urins säulenchromatographisch analysiert.

Bei 2 von 3 verdächtigen Kindern in der Gruppe bis zu 2 Jahre alt war schon eine erhöhte Gesamtaminosäurenausscheidung gefunden worden.
Chromatogramme:
1. B.C., ♂, 2 Monate alt, Diagnose: unstillbares Erbrechen, Dyspepsie, siehe Nr. 11 in Abbildung 16 und Tabelle 8 (identisch mit Chromatogramm Nr. 3 auf S. 39).
Es fällt auf eine relativ hohe Cystinausscheidung, Lysin, Arginin und Ornithin liegen im Normbereich. Dieser Befund spricht ebenso wie das Krankheitsbild gegen das Vorliegen einer Cystinurie.

2. B.C., ♀, 12 Monate alt, Diagnose: Pertussis bei Krampfleiden, siehe Nr. 21 in Abbildung 16 und Tabelle 8 (identisch mit Chromatogramm Nr. 5 auf S. 39).
Lysin, Tyrosin und Cystin treten vermehrt auf, deutliche Ausscheidung von Homocystin.

3. S.M., ♂, $1^{11}/12$ Jahre alt, Diagnose: Bronchitis bei cerebralem Anfallsleiden, siehe Nr. 26 in Abbildung 16 und Tabelle 8.

In diesem Falle wurde das Serum chromatographisch analysiert. Mäßig erhöhte Cystin- und Methioninkonzentration, Verdacht auf Homocystinaemie, weitere Untersuchungen sind notwendig.

Die Untersuchung eines 24 Stunden-Sammelurins von einem an Cystinurie erkrankten Kind (P.P., ♀, 9 Jahre alt, Nr. 8 in Abbildung 18 und Tabelle 10, die Diagnose war bekannt, bevor dieser Test durchgeführt wurde) ergab die Konzentration von 1,1 µM SH-Gruppen pro ml Urin, der pH-Wert betrug 5,6. Bei diesem pH-Wert beträgt die Löslichkeit von Cystin ungefähr 300 µg pro ml Urin [36]. Da 1,1 µM Cystin 264 µg entsprechen, wird die Löslichkeitsgrenze in dieser Probe nicht erreicht. Im Nachturin ist aber eine höhere Konzentration zu erwarten [36], so daß dort die Löslichkeitsgrenze von Cystin sicher überschritten wird und dieses auskristallisiert.

Auch bei W.B., ♀, 3 Jahre alt, war die Diagnose Homocystinurie vor dieser Untersuchung bekannt, die SH-Gruppenkonzentration ist stark gegenüber der Norm erhöht: 1,26 µM pro ml Urin, siehe Nr. 9 in Abbildung 17 und Tabelle 9.

5. Diskussion der Ergebnisse

Mit zunehmendem Alter werden innerhalb der in den Abbildungen 16 - 18 angegebenen Spannweiten immer höhere Kreatininkonzentrationen bestimmt, die Punktwolken rücken nach rechts. Vergleicht man die Verbindungslinien der Medianwerte in den Abbildungen 16 - 18 miteinander, so erkennt man, daß mit fortschreitendem Alter der Kinder die Steigung abnimmt, die SH-Gruppenkonzentration steigt nicht in dem Maße an wie die Kreatininkonzentration. Deshalb scheint die oben beschriebene Bildung von Altersgruppen notwendig zu sein. Bei weiteren Untersuchungen von Fällen der Cystinurie und Homocystinurie ist aber zu prüfen, ob die SH-Gruppenkonzentration nicht so stark vom Normalkollektiv abweicht, daß die altersabhängigen Unterschiede der SH-Gruppenausscheidung, bezogen auf die Kreatininkonzentration, vernachlässigt werden können.

STEIN et al. [25] haben festgestellt, daß bei Vorliegen von Morbus WILSON im Urin höhere Cystinkonzentrationen vorkommen können als in Fällen von Cystinurie. Dabei wurde aber keine

Cystinsteinbildung beobachtet. Differentialdiagnostisch ist also bei erhöhter SH-Gruppenkonzentration im Urin auch an Morbus WILSON zu denken.

In einer Versuchsreihe mit 40 Urinproben wurde untersucht, ob die aus Aminosäuren aufgebauten höhermolekularen Substanzen (Peptide, Albumine) einen wesentlichen Einfluß auf die mit der DTNB-Methode bestimmte SH-Gruppenkonzentration haben. Diese wurde deshalb vor und nach Enteiweißung mit Trichloressigsäure (unter Berücksichtigung des durch Zusatz von Trichloressigsäure aufgetretenen Verdünnungsfaktors) bestimmt. Der Unterschied betrug in der Regel weniger als 10%, mit zunehmender Albuminurie wird diese Differenz allerdings größer, z.B. bei einer Nephrose mit einer Eiweißausscheidung von ungefähr 10 °/oo Esbach lag sie bei 20%. Im Hinblick auf die Anwendung der DTNB-Methode als Screening-Test auf Cystinurie und Homocystinurie spielt diese zusätzliche Erhöhung der SH-Gruppenkonzentration durch Eiweißkörper keine Rolle, da bei den gesuchten Krankheiten die SH-Gruppenkonzentration stark erhöht ist und die Krankheitsbilder sich durch weitere klinische Untersuchungen gut voneinander abgrenzen lassen.

Treten SH-Gruppen vermehrt im Urin auf (d.h. der Wert überschreitet die Spannweite des Normalbereiches der entsprechenden Altersgruppe), so empfiehlt sich folgendes Vorgehen zur weiteren Diagnostik:

1. Durchführung mehrerer Kontrolluntersuchungen des Urins auf SH-Gruppen im Verlauf der nächsten Tage und Wochen. Dadurch kann festgestellt werden, ob es sich um eine permanente oder vorübergehende Erscheinung handelt, wobei eine permanente für das Vorliegen einer angeborenen Stoffwechselkrankheit sprechen kann.
2. Testung des Urins auf eine massive Albuminurie, die u.a. auf ein nephrotisches Syndrom hinweist.
3. Bei Vorliegen einer Symptomatik, die für eine angeborene Stoffwechselkrankheit spricht (in diesem Falle Cystinurie und Homocystinurie) ist eine chromatographische Analyse (Dünnschicht- oder Säulenchromatographie) des Urins erforderlich, nur so können Cystin oder Homocystin getrennt voneinander bestimmt

werden.

4. Weitere klinische Untersuchungen zur Abklärung des Krankheitsbildes.

C. Zusammenfassung

Es wird über Versuche berichtet, Hyperaminoazidurien aufzudecken, die auf angeborenen Stoffwechselkrankheiten beruhen. Die dabei angewendeten Methoden sollen die Untersuchung einer großen Zahl von Urinproben innerhalb kurzer Zeit mit einem geringen Arbeitsaufwand erlauben. Die Reihenuntersuchung (Screening) wird durchgeführt mit dem Ziel, eine Stoffwechselkrankheit möglichst dann schon zu entdecken, bevor bedrohliche Symptome aufgetreten sind, damit durch frühzeitige gezielte Behandlung (sofern eine solche bekannt ist) größere Schäden verhindert werden.

Zunächst wird eine colorimetrische Methode zur Bestimmung der Gesamtaminosäurenkonzentration im Urin mit Hilfe von 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure beschrieben, das Verfahren wurde unter Verwendung des Auto-Analyzer-Systems automatisiert. Der Bezug auf die Kreatininkonzentration in derselben Urinprobe macht das Sammeln des in 24 Stunden ausgeschiedenen Urins unnötig, es genügen zur Bestimmung 0,1 ml Urin des Kindes.

Insgesamt wurde bei 480 Kindern im Alter bis zu 17 Jahren die Gesamtaminosäurenkonzentration im Urin gemessen. Entsprechend der altersabhängig verschiedenen Kreatininkonzentration wurden Altersgruppen gebildet. Schon vor dieser Untersuchung bekannte Fälle von Stoffwechselkrankheiten ergaben gegenüber dem Normalkollektiv stark erhöhte Werte, neue Erkrankungsfälle wurden nicht sicher nachgewiesen.

Eine zweite Methode zur Reihenuntersuchung des Urins auf angeborene Stoffwechselkrankheiten, die Bestimmung der SH-Gruppen- und S-S-Brücken-haltigen Aminosäuren, wird beschrieben. Die S-S-Brücken werden mit Hilfe von Natriumcyanid gespalten, und die im Urin insgesamt enthaltenen SH-Gruppen werden durch Umsetzung mit 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) bestimmt. Auch dieses Verfahren ist sowohl manuell als auch halbautomatisch mit 1,2 ml Urin durchführbar.

Bei 600 bis zu 17 Jahre alten Kindern wurden die SH-Gruppen- und S-S-Brücken-haltigen Aminosäuren im Urin gemessen. Ihre

Konzentration wurde auf die Kreatininkonzentration bezogen, wobei ein jeweils schon bekannter Fall von Cystinurie und Homocystinurie durch stark erhöhte Werte auffiel. Auch bei diesen Untersuchungen wurden neue Erkrankungsfälle nicht sicher entdeckt.

Bei beiden Untersuchungsmethoden, die als Suchtests auf angeborene Stoffwechselkrankheiten eingesetzt werden, ist bei auffälligen Werten eine Analyse der Aminosäuren des Urins mittels Dünnschicht-und Säulenchromatographie zur weiteren Abklärung der Befunde notwendig.

Literaturverzeichnis

1)	C.E. DENT, J.G. HEATHCOTE and G.E. JORON	The Pathogenesis of Cystinuria. J. Clin. Invest., 33, 1210 (1954)
2)	STANBURY, WYNGAARDEN and FREDRICHSON (Editors)	The Metabolic Basis of Inherited Disease. Second Edition 1966 by M^{c} Graw-Hill, Inc., S. 415
3)	C.E. DENT and J.M. WALSHE	Amino Acid Metabolism. Brit. M. Bull., 10 (1954), S. 247
4)	wie 2)	S.1212
5)	K. SCHREIER	Eiweißstoffwechsel, im Handbuch der Kinderheilkunde, Bd.IV, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1965, S.66-67
6)	J.H. NORTRUP	A Convenient Method for the Formol Titration. J. Gen. Physiol., 9 (1926), 767
7)	A.A. ALBANESE and V. IRBY	Determination of Urinary Amino Nitrogen by the Copper Method. J. Biol. Chem., 153 (1944), 583
8)	D.D. VAN SLYKE, D.A. MAC FADYEN and P.B. HAMILTON	The Gasometric Determination of Amino Acids in Urine by the Ninhydrin-Carbon Dioxide Method. J. Biol. Chem., 150 (1943), 251
9)	A. KHACHADURIAN, W.E. KNOX and A.M. CULLEN	Colorimetric Ninhydrin Method for Total Alpha Amino Acids of Urine. J. Lab. Clin. Med., 56 (1960), 321
10)	E.D. SCHILLING, P.I. BURCHILL and R.A. CLAYTON	Anomalous Reactions of Ninhydrin. Anal. Biochem., 5 (1963), 1
11)	E.G. FRAME, J.A. RUSSEL and A.E. WILHELMI	The Colorimetric Estimation of Amino Nitrogen in Blood. J. Biol. Chem., 149 (1943), 255
12)	J.F. GOODWIN	On the Measurement of Urinary Amino Nitrogen with 1-Fluoro-2,4-Dinitrobenzene. Clin. Chim. Acta, 21 (1968), 231
13)	K. SATAKE, T. OKUYAMA, M. OHASHI and T. SHINODA	The Spectrophotometric Determination of Amine, Amino Acids and Peptide with 2,4,6-Trinitrobenzene-1-sulfonic Acid. J. Biochem., 47 (1960), 654
14)		Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 6. Auflage, Synopsis des Harns, S.498

15)	D.W. PALMER and T. PETERS, JR	Simple Automatic Determination of Amino Groups in Serum/Plasma Using Trinitrobenzene Sulfonate, Automation in Analytical Chemistry, 1966 by Technicon Chromatography Corp., Ardsley (Chauncey), New York
16)	H. SCHÖNENBERG	Papierchromatographische Untersuchungen der Aminosäurenausscheidung im Urin gesunder Menschen. Klin. Wschr., 34 (1956), 442
17)		Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 6. Auflage, Statistik 170.10
18)	S.W. RICHARDS, G.N. DONNELL, W.A. WILSON, D. STOWENS and T. PERRY	The Oculo-Cerebro-Renal Syndrome of Lowe. Am. J. Diseases Children, 109 (1965), 185
19)	H.K. BERRY	Amino Acid Excretion in Urine of Normal Infants and Children. Pediatrics, 25 (1960), 983
20)	SUNDERMAN and BOERNER	Normal Values in Clinical Medicine, Philadelphia (1950), S.353
21)	D. O'BRIEN and F.A. IBBOTT	Laboratory Manual of Pediatric Micro- and Ultramicrobiochemical Techniques, Harper & Row Publishers, New York 1962, 3. Aufl.
22)	D.A. APPLEGARTH, D.F. HARDWICK and P.M. ROSS	Creatinine Excretion in Children and the Usefulness of Creatinine Equivalents in Amino Acid Chromatography. Clin. Chim. Acta, 22 (1968), 131
23)	wie 2)	S.424
24)	wie 2)	S.421
25)	W.H. STEIN, A.G. BEARN and S. MOORE	The Amino Acid Content of the Blood and Urine in Wilson's Disease. J. Clin. Invest., 33 (1954), 410
26)		Symposium: "The Treatment of Amino Acid Disorders". Amer. J. Dis. Child., 113 (1967)
27)	H. HARRIS and F.L. WARREN	Quantitative Studies on the Urinary Cystine in Patients with Cystine Stones and their Relatives. Ann. Eugenics, 18 (1953), 125
28)	C.T. MÖRNER	Cystin Calculi. Upsala läk. förh., 25 (1920), 265

29)	H.B. LEWIS	The Occurance of Cystinuria in Healthy Young Men and Women. Ann. Int. Med., 6 (1932), 183
30)	wie 2)	S.421
31)	wie 2)	S.420
32)	M.X. SULLIVAN, W.C. HESS and H.W. HOWARD	The Quantitative Estimation of Both Cystine and Cysteine in Mixture. J. Biol. Chem., 145 (1942), 621
33)	G.L. ELLMAN	Tissue Sulfhydryl Groups. Arch. Biochem. Biophys., 82 (1959), 70
34)	PULEWKA and WINZER	Untersuchungen über die Reaktionen des Cystins mit Schwefel und Cyanalkali. Arch. Exp. Path. u. Pharmakol., 138 (1928), 154
35)	V. KAUPPINEN and C.-G. GREF	Automated Determination of Total Sulfhydryl Groups and Glutathione Reductase Activity in Biological Material. Presented at the European Technicon Symposium "Automation in Analytical Chemistry", 1966
36)	C.E. DENT and B. SENIOR	Studies on the Treatment of Cystinuria. Brit. J. Urol., 27 (1955), 317

Danksagung

Herrn Professor Dr.med. Adalbert L o e s c h k e möchte ich für die Förderung und die Ermöglichung der Durchführung meiner Dissertationsarbeit an seiner Klinik meinen besonderen Dank aussprechen.

Herrn Oberarzt Dr.med. Eberhard M ö n c h gebührt mein Dank für die Anregung und Fragestellung dieser Arbeit und für das Interesse, das er an ihrem Fortgang nahm.

Herrn Professor Dr.med. Günter F u c h s danke ich für die Beratung hinsichtlich der statistischen Fragen.

Zu danken habe ich Herrn Priv. Doz. Dr.med. H. H e l g e und Herrn Dr. Tohju I c h i m u r a, Tokyo, die mir die Ergebnisse der Bestimmung des α-Aminostickstoffs nach Van SLYKE in 27 Sammelurinen zur Verfügung stellten.

Lebenslauf

Am 2.11.1937 wurde ich als Sohn des Kalkulators Hermann Siemes in Remscheid geboren. Nach dem Besuch der Volksschule von 1945 - 1949 und der Realschule von 1949 - 1955 wurde ich für 3 Jahre Laboranten-Lehrling bei den Chemischen und Lackfabriken Herberts in Wuppertal, wo ich nach Abschluß der Lehre noch 2 Jahre angestellt war; von 1957 bis 1961 war ich Schüler des Städt. Abendgymnasiums in Wuppertal. Nach dem Abitur im Oktober 1961 studierte ich 11 Semester Medizin, davon 10 Semester an der Freien Universität Berlin und 1 Semester an der Universität Göttingen. Das Staatsexamen bestand ich im Oktober 1967, danach war ich als Medizinalassistent 4 Monate auf einer Chirurgischen Abteilung des Städt. Behring-Krankenhauses in Berlin, 10 Monate in der Universitäts-Kinderklinik der Freien Universität Berlin und 6 Monate auf einer Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses in Berlin-Spandau tätig. Zur Zeit bin ich Medizinalassistent auf der Gynäkolog.-Geburtshilflichen Abteilung des Städt. Rudolf-Virchow-Krankenhauses in Berlin.

Druck: Dissertationsdruckstelle, 1 Berlin 33